

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bakalářská práce

Sestřihové varianty genu GCPII a jejich role v nádorovém bujení

Splice variants of the gene coding for GCPII and their role in cancer development

Helena Jindrová

Školitel: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha 2013

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. A všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Místo a datum:

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych především ráda poděkovala doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, Csc., bez jehož podpory by tato práce nikdy nevznikla.

Můj velký dík patří také Mgr. Václavu Navrátilovi za jeho vedení, odborné rady a trpělivost.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam zkratek	7
Cíle práce	8
Úvod s přehledem literatury k zadanému tématu.....	9
Úpravy vznikající mRNA	9
Alternativní sestřih a jeho regulace.....	16
Význam alternativního sestřihu v rakovině prostaty	21
Osteopontin	25
Alternativní sestřih osteopontinu	26
Androgenový receptor.....	27
PSMA jako marker.....	29
Materiál	34
Přístroje	34
Chemikálie	34
Metody	36
Izolace RNA z tkání.....	36
Reverzní transkripce	37
Preamplifikace variant	37
Absolutní kvantifikace sestřihových variant PSMA	38
Výsledky	41
Absolutní kvantifikace variant PSMA	46
Statistické zpracování standardů a kalibračních křivek	46
Stanovení celkového množství delecí	49
Stanovení delecí v (preamplifikovaných) variantách PSMA.....	50
Diskuze.....	52
Souhrn	54
Seznam použité literatury.....	55

Abstrakt

Alternativním sestřihem mRNA může vznikat z jediného eukaryotického genu několik různých proteinů s odlišnou sekvencí aminokyselin, strukturou, a tedy i funkcí. Tento jev je složitě regulován. Může hrát významnou roli v nádorovém bujení. Například u alternativního sestřihu osteopontinu byl prokázán jeho vliv na metastazování a progresi nádoru prsu. Glutamátcarboxypeptidasa II (též prostatický specifický membránový antigen) se vyskytuje ve zvýšeném množství ve zdravé i nádorové prostatické tkáni. Je známo několik jejích sestřihových variant. U některých z nich byla zkoumána souvislost mezi jejich přítomností a postupem karcinomu prostaty v pacientech pomocí kvantitativního RT-PCR. O expresi dalších sestřihových variant nejsou zatím k dispozici žádné přesnější údaje. Mezi ně patří varianty s vynechaným exonem 6 anebo exonem 18. Cílem této práce bylo určit množství právě těchto delecí v několika biologických vzorcích.

Za pomoci kvantitativní polymerasové řetězové reakce bylo stanoveno množství delecí exonu 6 a exonu 18 v cDNA kódující prostatický specifický membránový antigen ze vzorků tkání pacientů s benigní prostatickou hyperplazií, nádorem prostaty a z buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty. Zároveň bylo stanoveno množství delecí v jednotlivých sestřihových variantách tohoto proteinu, které byly předpřipraveny pomocí polymerasové řetězové reakce. Zjistili jsme, že delece exonu 6 se vyskytuje u 10 % celkové mRNA, v případě delece exonu je to dokonce 18 až 20 %.

Význam těchto delecí ještě není znám. Je možné, že hrají stejně důležitou roli jako zkrácené varianty osteopontinu. Pak by tyto proteiny byly využitelné jako diagnostické a prognostické markery, které současné medicíně stále scházejí. V budoucnu bude třeba provést toto měření na větším počtu vzorků, a to jak benigních hyperplazií, tak karcinomů prostaty. Varianty, které schází exon 18, bylo nalezeno relativně velké množství, a to jak v hyperplazii, tak v nádorové tkáni. Z velkého množství transkriptu této varianty se dá usuzovat možná odlišná role proteinu vzniklého přepisem její RNA, než je dosud známá proteolytická role GCPII.

Abstract

Alternative splicing is a mechanism of generating distinct proteins that are encoded by the same gene. These proteins differ in amino acid sequence, overall structure and function. Splicing dysregulations have been shown to be implicated in several pathologic processes including cancer. For example, non-physiological splicing of osteopontin was proved to play a key role in cell progression of breast cancer. Glutamate carboxypeptidase II (also called prostate specific membrane antigen, PSMA) is present in both normal prostate and prostate cancer. Several splice variants of PSMA have been described and it has been suggested that the overexpression of some of them could be involved in the progression of prostate cancer. Nevertheless, more detailed investigation of each of the PSMA splice variant in terms of their occurrence in prostate cancer cells remains to be performed.

This thesis focuses on the exploration of the expression of PSMA splice variants with deleted exons 6 and 18 in samples of a cell line derived from human prostate cancer, benign prostate hyperplasia and prostate cancer. For this purpose, RT-PCR was utilized to determine the ratio of deletions of exons 6 and 18 in cDNA of the prostate specific membrane antigen. Furthermore, the ratio of deletions of exon 6 and 18 was determined in several full length PSMA variants. It was determined that up to 10% of the PSMA variants lack the exon 6 and up to 20 % of these variants have deletion of the exon 18.

The significance of these findings remains to be defined. In analogy to the function of alternative splice variants of osteopontin in breast cancer, the PSMA splice variants could play a role in prostate cancer and could thus serve as diagnostic and prognostic markers which current medicine still lacks. Moreover, since the amount of variants that lack exon 18 in benign hyperplasia and cancer tissue was relatively high, it cannot be excluded that the translated protein accomplishes a specific role in these cells. Nevertheless, more robust study needs to be performed in order to analyze these speculations.

(In Czech)

Seznam zkratek

AR	Androgenový receptor
ATP	Adenosin trifosfát
BPH	Benigní prostatická hyperplazie
CBP	Čepičku vázající enzym
CTD	C-terminální doména
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GCPII	Glutamátkarboxypeptidasa II
GS	Gleasonovo skóre
GTP	Guanosin trifosfát
IEP	Intron kódovaný protein
LNCaP	Buněčná linie odvozená od karcinomu prostaty
mRNA	Mediátorová RNA
OPN	Osteopontin
PSA	Prostatický specifický antigen
PSMA	Membránový antigen specifický pro prostatu (z angl. prostate specific membrane antigen)
qPCR	Kvantitativní polymerasová řetězová reakce
rRNA	Ribosomální RNA
RNA	Ribonukleová kyselina
RT-PCR	Reverzně transkripční polymerasová řetězová reakce
snRNP	Malé jaderné ribonukleoproteinové částice
tRNA	Transferová RNA
WT	Přirozená forma (z anglického wild type)

Cíle práce

Zpracovat rešerši o alternativním sestřihu mRNA s důrazem na

- Popis dějů spojených se sestřihem mRNA
- Využití alternativního sestřihu pro diagnostiku nádorových onemocnění
- Popis GCPII jako markeru rakoviny prostaty

Kvantitativně detekovat vybrané sestřihové varianty GCPII ve vzorcích prostat a v buněčné linii odvozené od nádoru prostaty pomocí RT-PCR.

Úvod s přehledem literatury k zadanému tématu

Jedním ze základních stavebních kamenů každé eukaryotické buňky jsou proteiny. Každý protein je kódovaný úsekem jaderné DNA označovaným jako gen. Dříve, než může vzniknout protein, se DNA musí přepsat do RNA, teprve sekvenční informace obsažená v molekule RNA se překládá v ribosomu na funkční polypeptidový řetězec (protein). RNA vznikající přepisem genu plní funkci jakéhosi posla přenášejícího informaci mezi genomovou DNA a ribosomem, odtud také její anglický název messenger RNA (mRNA). Tato mRNA prochází během svého vzniku řadou úprav, které vedou k tomu, že není sekvenčně identická s původním genem. Nejzásadnější změnou je vyštěpování určitých úseků RNA, tzv. sestřih. Tyto nekódující sekvence (nejsou překládány do proteinové sekvence) standardně představují velkou většinu sekvence genu. Jedná se o složitý proces za účasti velkého ribonukleo-proteinového komplexu a jeho důležitou vlastností je, že RNA pocházející z jednoho genu může být sestřižena více způsoby, což v konečném důsledku vede k tomu, že jediný gen kóduje několik odlišných proteinových variant.

Vzhledem k tomu, že tyto proteinové varianty mohou mít odlišnou funkci, je zřejmé, že tento děj musí být dobře regulován. Sestřih mRNA a jeho regulace jsou předmětem současného vědeckého zkoumání, navíc se ukazuje, že změny v sestřihu některých genů mohou mít spojitost s rakovinnými onemocněními a mohou se tedy využít jako nový diagnostický nástroj. V následující rešerši se zaměřím na základní popis samotného sestřihu, jeho regulace a především jeho využití pro diagnostiku rakoviny prostaty. Zvláštní kapitola pak bude patřit námi zkoumanému markeru rakoviny prostaty zvanému prostatický specifický membránový antigen (PSMA, též glutamátcarboxypeptidasa II). Studium zastoupení vybraných sestřihových variant PSMA v prostatických tkáních pak bude předmětem praktické části této práce.

Úpravy vznikající mRNA

Jak již bylo zmíněno, proteiny se tvoří translací mRNA, která předtím vznikne přepisem z DNA pomocí RNA polymerasy II. RNA polymerasy se skládají ze dvou polypeptidů tvořících velké podjednotky a několika dalších menších podjednotek. Jednotlivé enzymy jsou

si navzájem podobné. Další druhy RNA syntetizují jiné polymerasy, například většina ribosomálních RNA (rRNA) je tvořena RNA polymerasou I a tento proces je situován v jadérku. Veškerá protein kódující RNA je syntetizována RNA polymerasou II stejně jako některé malé jaderné RNA. Zbylé rRNA a transferové RNA (tRNA) jsou přepisovány RNA polymerasou III, tento proces probíhá stejně jako transkripce mRNA v nukleosomu [1]. RNA polymerasa obsahuje C-terminální doménu (CTD), kterou lze rozdělit do tří úseků. První je ohebná spojovací oblast, druhá část se skládá z repetitivní aminokyselinové sekvence YSPTSPS a třetí částí je C-terminální oblast. Lidská CTD obsahuje 52 repetitivních, ale jejich počet se liší mezi organismy. Díky pohyblivosti a umístění této domény je možná vazba transkripčních faktorů právě na ni, zároveň se tyto faktory nachází v blízkosti nově vznikajícího transkriptu. Posttranslační úpravy této části proteinu jsou velice důležité pro její strukturu a funkci. Modifikacemi aminokyselin dochází k regulaci vazby faktorů změnou konformace [2].

Pre-mRNA, tzv. primární transkript, vznikající přepisem RNA polymerasou II, je před jejím použitím jako šablony ke vzniku proteinu upravena [3]. RNA polymerasa se skládá ze dvou velkých podjednotek, které tvoří kladně nabitou štěrbinu [4]. Nasedá na DNA v místě promotoru, do vzdálenosti několika desítek bazí od počátku transkripce. Tím vzniká uzavřený komplex s nerozvolněnou DNA. Ta se musí pro zahájení procesu přepisu částečně rozvolnit za vzniku otevřeného komplexu. Vazbu ovlivňují represory a aktivátory. Samotné vazbě polymerasy zpravidla předchází vazba proteinu vázajícího se na sekvenci TATA box, tedy sekvenci bohatou na pyrimidinové báze. Kromě tohoto proteinu napomáhají vazbě polymerasy další faktory. Modifikacemi aminokyselinových zbytků dochází ke konformační změně a zahájení procesu přepisu DNA na RNA. Také se usnadní vazba dalších proteinů bohatých na aminokyseliny arginin a serin, které obsahují RNA vázající doménu a doménu bohatou na dvě právě zmíněné aminokyseliny. Ta je potřebná pro protein-proteinové interakce [5].

Vznik mRNA je zahájen tvorbou guanosinové čepičky, která je poté N7 methylována. Čepička chrání mRNA před degradací exonukleasami [6]. Na čepičku se váže Cap binding protein, který se dále váže na C-terminální doménu polymerasy. To je podstatné zejména proto, že celá

řada proteinů podílejících se na další úpravě mRNA se také váže na CTD a dostane se tak do prostorové blízkosti mRNA [7]. Fosforylace na různých místech CTD může vést k různým konformačním změnám, a tím i k odlišným aktivitám enzymu. Mezi nejdůležitější patří fosforylace druhého a pátého serinu v opakující se sekvenci [8].

Fosforylovaná CTD RNA polymerasy II napomáhá tvorbě guanosinové čepičky tím způsobem, že se na ni váží potřebné faktory, nebo je tvorba čepičky řízena fosforylací CTD, bez které nedojde k transkripci [9]. Napomáhá také polyadenylaci na 3' konci mRNA poté, co se do mRNA přepsala celá sekvence genu včetně signální sekvence AAUAAA, která se nachází 10 až 30 bází nad štěpicím a polyadenylačním místem. Vyskytuje se u 90% sekvenovaných polyadenylačních elementů, většina ze zbylých deseti procent obsahuje záměnu adenosinu za uracil [10]. Je rozpoznávána faktorem CPSF (Capping polyadenylation specificity factor). Pro jeho lepší vazbu na mRNA se na něj váže pomocný faktor CstF (Cleavage stimulation factor). Dále se váží štěpicí faktory, endonukleasy, které štěpením vytvoří místo pro připojení koncové sekvence. Tu dosyntetizuje poly(A)polymerasa, připojí 80-250 adenosinových zbytků [11]. Toto je podporováno fosforylovanou CTD, nicméně vazba polyadenylačních faktorů probíhá i v případě, že tato doména již není fosforylována [12]. Zřejmě je tomu tak proto, že CTD je defosforylována fosfatasami při ukončení polyadenylace. Někdy může dojít k tomuto procesu ještě před vytvořením koncové polyadeninové sekvence, a tedy někdy dochází k polyadenylaci na 3' konci až po tomto procesu [13].

Sestřih pre-mRNA, při kterém dojde k odstranění částí původní sekvence, je také spojen s CTD RNA polymerasy II [14]. Na guanosinovou čepičku se váže CBC (Cap binding complex), který se na rozdíl od Cap binding proteinu nachází v cytoplasmě. Spojuje 5' sestřihové místo s U1 snRNP (popsán dále), který se účastní sestřihu [15]. Samotný sestřih je popsán níže. Nakonec je mRNA exportována z jadra do cytoplasmy, kde se na ni váže ribosom, přičemž iniciaci translace ribosomem napomáhá cirkularizace mRNA, ke které dochází díky interakci komplexu vázaného na čepičku a proteinů vázaných na polyA konci mRNA [16]. Přechodem z iniciační fáze do elongační dochází k hyperfosforylaci CTD. To má za následek výměnu iniciačních transkripčních faktorů za elongační [17].

V mRNA se nachází intervenující (introny) a exprimované sekvence (exony). Intervenující části jsou odstraňovány v procesu sestřihu a nejsou využity jako templát pro výrobu proteinu. Obvyklý počet exonů na jeden gen je osm, nachází se v mRNA ve stejném pořadí jako v DNA. Zpravidla nepřesahují velikost 800 nukleotidů. Introny se svou velikostí mohou velmi lišit, dosahují délky od okolo 30 nukleotidů [18], po délku nejdelšího známého intronu, který dosahuje délky téměř 750 tisíc nukleotidů [19].

Intronů existuje několik druhů [5]. Introny skupin I a II jsou samosestřihovací introny, někdy označované jako molekulární paraziti [20]. Tyto dvě skupiny se odlišují mechanismem sestřihu RNA. Samosestřihovací introny byly objeveny v roce 1982 Thomase Cechem v *Tetrahymena thermophila* [21], jednalo se o první příklad chemické reakce, kterou v živém organismu katalyzuje RNA a nikoliv protein. Ostatní introny nejsou samosestřihovací a nejsou děleny do skupin označovaných číslicemi, k jejich úpravě je zapotřebí dalších enzymů nebo ribozymů [5].

Introny skupiny I se nachází v bakteriálním, organelovém, bakteriofágovém a virovém genomu a v genech kódujících ribozomální RNA eukaryot [20]. Tyto introny utvoří konzervovanou terciární strukturu se smyčkou s reakčním místem intronu. Vazby ve smyčce se účastní 4 páry bazí podléhající Watson Crickovskému párování a další dva páry GU spojené dvěma vodíkovými vazbami. Tento poměr musí být zachován, ale na pořadí jednotlivých párů nezáleží. Do reakční kapsy intronu se naváže volný guanosin, který atakuje sestřihové místo na 5' konci intronu (sekvence UA). Volný konec exonu pak atakuje druhý konec intronu. Tím dojde k jeho vyštěpení.

Introny skupiny II se vyskytují jen vzácně u říše *Archea*. U říše *Bacteria* se nachází v 25% případů sekvenovaných genomů, obvykle v malém množství. Byly nalezeny dále v mitochondriálních a chloroplastových genomech, genomech hub, rostlin, protist a kroužkovců [22]. Nenachází se v eukaryotickém jaderném genomu [20]. Skládají se z katalytické RNA a sekvence kódujícího proteinu, multifunkční reverzní transkriptasy, stabilizující katalyticky aktivní RNA strukturu. Po sestřihu zůstává vázaná na vystřižené intronové RNA a napadá DNA. Transkriptasovou aktivitou se reverzně sestřihne do DNA.

Introny skupiny II jsou pravděpodobně evolučními předky spliceosomu a retrotranspozonů eukaryot [20].

Mechanismus katalýzy sestřihu intronů skupiny II je podobný mechanismu sestřihu ve spliceosomu. Dochází ke dvěma transesterifikačním reakcím za vzniku lariátu (tento název je odvozený od rozvětvené struktury připomínající laso). Atakující skupinou je 2'OH adenosinu ve větvicím místě uvnitř sestřihované sekvence, nikoliv volného nukleotidu jako je tomu u sestřihu intronů prvního druhu. Dochází k tvorbě 2'-5' vazby tohoto adenosinu s prvním nukleotidem intronu. Nově vzniklý volný konec exonu 1 pak atakuje 3'konec exonu 2. První štěpení a vznik první fosfodiesterové vazby jsou spojené reakce a probíhají najednou. Není třeba spotřeby energie ve formě štěpení ATP [23].

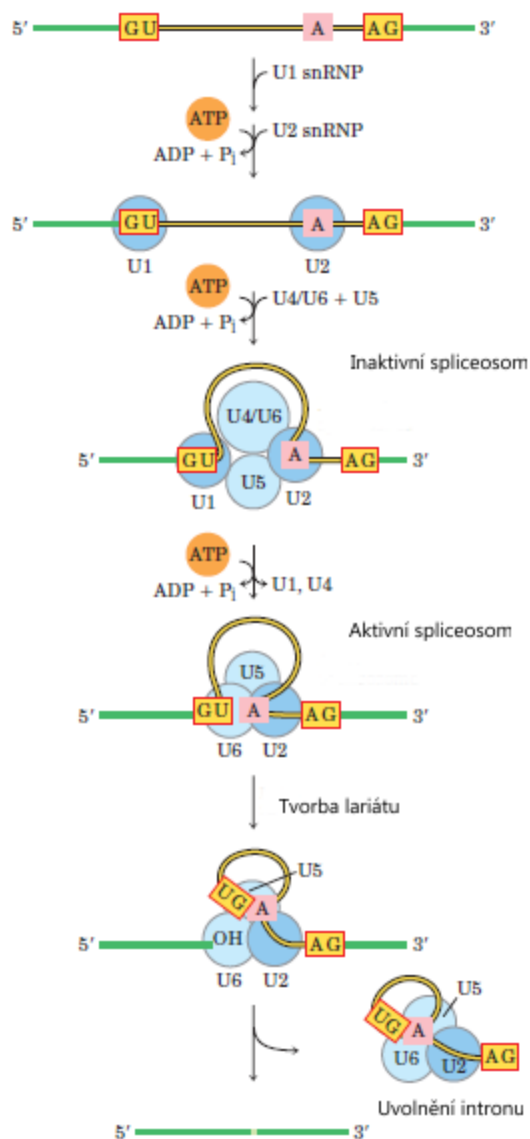
Třetí skupinou intronů jsou introny sestřihované za spotřeby GTP a ATP. Nachází se v pre-tRNA, ta je nejprve štěpena endonukleasou za vzniku dvou polovin tRNA a lineárního intronu. Obě části tRNA pak spojí tRNA ligasa za vzniku konečné tRNA [24]. Některé tRNA jsou součástí pre-rRNA, se kterou jsou přepisovány a následně vyštěpeny. Takto jsou tvořeny tRNA pro aminokyseliny isoleucin, alanin nebo glutamát. Toto vmezezení tRNA bylo poprvé pozorováno u bakterie *E. coli* [25].

Sestřih pre-mRNA probíhá u eukaryot v jádru na komplexu nazývaném spliceosom. K sestřihu dochází již během transkripce, ale může probíhat i po jejím ukončení, to zejména na 3' konci mRNA. Proces musí být velmi přesný, aby nedošlo k posunutí čtecího rámce. Začátek intronu je obvykle označen sekvencí GU a konec sekvencí AG. Uvnitř intronu se nachází adenosin důležitý pro průběh celé reakce, kterou zahajuje nukleofilním atakem. Spliceosom se skládá z proteinů a RNA a má charakter ribozymu metaloenzymu, protože katalytické místo se nachází na RNA a potřebuje pro svou funkci kationty Mg^{2+} sloužící ke stabilizaci odcházejících skupin [26].

Spliceosom obsahuje několik malých jaderných ribonukleových proteinových částic (snRNP), které se váží na mRNA a přibližně 50 až 100 dalších faktorů [27]. Váží se RNA-RNA interakcí mezi těmito částicemi a pre-mRNA i mezi sebou navzájem. Prostorová struktura

těchto faktorů je vysoce konzervovaná v organismech od kvasinek po člověka. Na začátku intronu se nachází polypyrimidinové místo dlouhé obvykle 10 bazí U nebo C a končící AG. Polypyrimidinové místo, 5' sestřihové místo a větvicí místo jsou rozpoznávány faktory, které jsou později nahrazeny příslušnými snRNP [28]. Samotné katalytické místo tvoří dvojice faktorů U2 snRNP a U6 snRNP. Některé z těchto faktorů se váží přímo na CTD RNA polymerasy II, ale celý proces ještě není zcela objasněn [29].

V první transesterifikační reakci dojde k ataku adenosinu z větvicího místa intronu na 3' konec. Dojde k vyštěpení jednoho konce intronu, který tím utvoří strukturu lariátu. Volný konec exonu pak v další transesterifikační reakci napadne druhý konec intronu, který je tímto zcela vyštěpen, a exony jsou spojeny. Upravená mRNA obsahuje exony těsně vedle sebe bez přerušení introny. Dalšími faktory napomáhající vyštěpení intronu jsou U1 snRNP, U4 snRNP a U5 snRNP, sled reakcí je popsán na obrázku 1 na straně 15. Přesný mechanismus, tedy dvojnásobná transesterifikace, byla objevena až po objevení intronů II. druhu, které podléhají stejné reakci a intron je vyštěpen ve formě lariátu. Předpokládá se, že introny II. skupiny jsou evolučními předky spliceosomálního sestřihu [26]. Tento komplex bývá také nazýván větší spliceosom nebo také U2 dependentní spliceosom a je jím vystřihována většina intronů (introny U2 typu) [28].



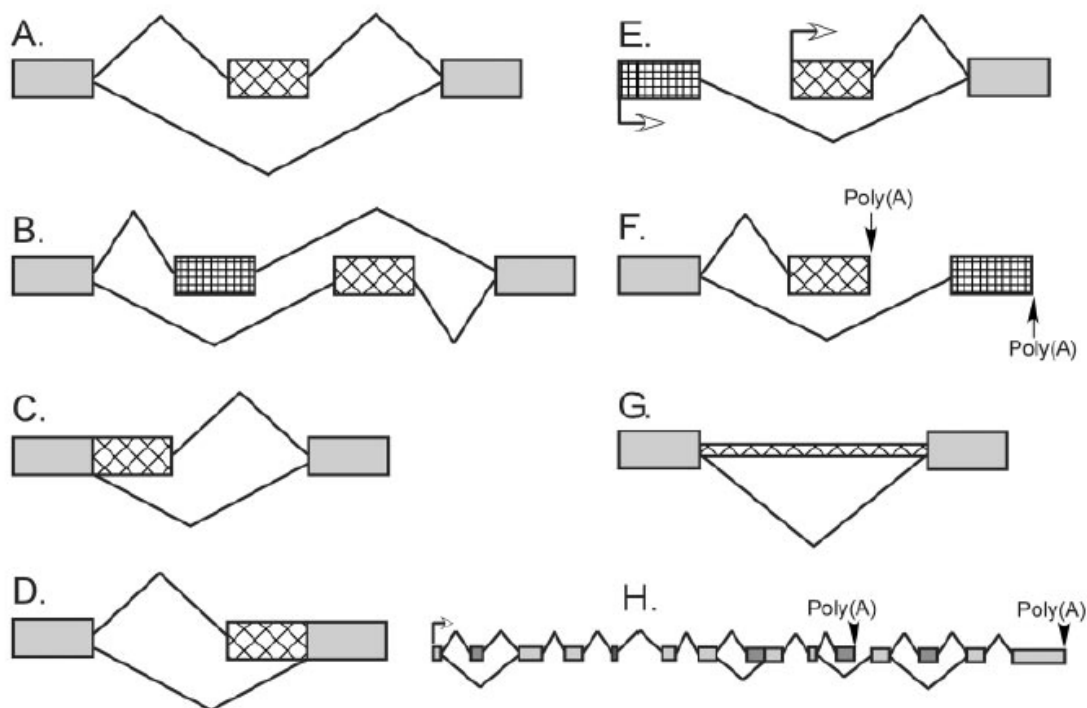
Obrázek 1 Sestřih mRNA na spliceosomu Reakci zahajuje U1 snRNP a U2 snRNP, reakční jádro tvoří RNA ve faktorech U2 snRNP a U6 snRNP, U5 snRNP umožňuje druhou transesterifikační reakci. Nakonec spliceosom opouští sestřiženou mRNA. Upraveno podle [5].

Druhou variantou je takzvaný menší spliceosom, který na rozdíl od většího spliceosomu sestřihuje introny typu U12. Tyto introny jsou většinou ohraničené sekvencemi AT-AC a jsou na rozdíl od U2 intronů vysoce konzervované na 5' konci. Tvoří 0,5 % genomu eukaryot. Nejčastěji se nachází v genech zajišťujících přenos a zpracování informace jako DNA

replikace, opravu, transkripce, upravování RNA a translace, ale byly nalezeny i v genech pro tvorbu cytoskeletu, napětově řízené iontové kanály a vezikulární transport [28]. Reakce sestřihu probíhá za pomoci U11 snRNP, U12 snRNP, U4atac snRNP, U6atac snRNP a U5 snRNP stejných jako ve větším spliceosomu [30]. Písmena atac v názvech symbolizují jiné sekvence na sestřihových místech, než jsou v klasických intronech. Mají velmi podobnou sekundární strukturu jako U2 intronové snRNP, ale odlišnou sekvenci. U12 snRNP rozeznává větvicí místo, vytváří RNA duplex s vyčnívajícím adenosinem větvicí části analogicky U2 snRNP u U2 intronů. U11 snRNP interaguje s 5' koncem intronu [26]. U11 a U12 snRNP se v jádře vyskytují v komplexu. V tomto stavu také reagují s mRNA. Komplex tří U6atac snRNP, U4atac snRNP a U5 snRNP pak tvoří samotný spliceosom. Po sestřihu se komplex rozpadá [31]. Oba tyto druhy intronů se mohou nacházet na stejném genu a mohou sdílet stejné proteinové částice [30].

Alternativní sestřih a jeho regulace

Sestřih pre-mRNA neprobíhá vždy stejně na stejných místech. Z jednoho úseku DNA může buňka vytvořit více proteinů více či méně podobných. Většina exonů je konstitutivní, vždy sestřihovaná a přítomná v mRNA translatované na ribozomu. K úpravě exonů může dojít několika způsoby, jak je znázorněno na obrázku 2 na straně 15. Exony, které se vyskytují v konečné mRNA jen někdy, se nazývají exonové kazety, proces jejich vynechání se nazývá exon skipping. Některé z těchto exonů jsou vzájemně vylučující, to znamená, že je přítomna vždy právě jedna varianta exonu. Exony mohou být zkrácené nebo prodloužené změnou polohy jednoho ze sestřihových míst. Další metodou tvorby odlišného proteinu je neúspěšné odstranění, tedy ponechání intronu v sekvenci (intron retention). Změny v proteinu mohou vést ke změně enzymatické aktivity, změně ligandu, lokalizaci proteinu nebo allosterické modulaci [32].



Obrázek 2 Mechanismy alternativního sestřihu Šedé exony jsou zahrnuty v konečné mRNA.

A) Kazetový exon může a nemusí být zahrnut ve výsledné mRNA.

B) V případě vzájemně se vylučujících exonů se nachází ve výsledné mRNA pouze jeden z možných exonů.

C), D) Alternativní 3' a 5' sestřihová místa ústí v prodloužené nebo zkrácené exony.

E), F) Alternativní promotory a polyadenylační místa ústí ve změnu 3' a 5' sestřihového místa.

G) Část intronu může být zahrnuta v produktu nebo vystřižena.

H) Na jedné pre-mRNA může dojít k několika typům změn exonů

Upraveno dle [33].

Alternativní sestřih lidského genomu se vyskytuje nejméně u 35 % genů, z toho většina (54 %) na 5' nepřepisovaném konci. Množství genů podléhajících alternativnímu sestřihu roste s větším počtem dat získaných sekvenací. Podle databáze Aceview podléhají alternativnímu sestřihu geny pro všechny z následujících proteinů z NAALADase genové rodiny: PSMA (gen *FOLH1*), PSMAL (*FOLH B*), GCPIII (*NAALAD2*), NAALADase L (*NAALADL1*), NAALADase L2 (*NAALADL2*) a PGCP (*PGCP*). Z příbuzných transferrinových receptorů podléhají alternativnímu sestřihu oba geny, gen pro transferinový receptor 1 (gen *TFRC*)

i transferinový receptor 2 (gen *TFR2*). Alternativní úprava uprostřed sekvence se nachází u 30 % genů s alternativním sestřihem a varianty lišící se na 3' nepřepisovaném konci má 47 % sestřihovaných genů. Součet je vyšší než 100 %, protože jednotlivé jevy se navzájem nevylučují. Okolo 20 % případů alternativního sestřihu se liší v akceptorovém místě (3' konec intronu) okolo 16% v donorovém místě (5' konec intronu) a okolo 30% obsahuje exon přítomný jen v jedné variantě. Pětina případů variant lišících se na 5' místě obsahuje alternativní 5'exon, pětina obsahuje jiný transkripční start a intron navíc. U 3' lišících se variant, desetina obsahuje alternativní exon, třetina obsahuje různé konce s různým polyadenylačním místem a intronem navíc. Z celkového počtu alternativně sestřihovaných mRNA z lidského genomu bylo 80 % sestřihů na 5' nepřepisovaném místě, což nemá vliv na vznikající protein, stejně jako 19 % alternativních sestřihů na 3' nepřepisovaném místě. Pouze 20 % případů se vyskytuje v kódující oblasti a má vliv na protein [34]

Posun čtecího rámce byl zjištěn u 59 % případů, z nich asi pětina byla kompenzovaná, to znamená, že dále byl v sekvenci exon navíc nebo jiné sestřihové místo, které posun čtecího rámce vyrovná. Asi u poloviny případů pouze chybí exon, z toho většina se nachází u 3' konce, takže ovlivňuje jen C-konec proteinu, začátek proteinu je kódován normálním čtecím rámcem. V případě, že se vezmou v úvahu neobvyklá sestřihová místa, například GC a AG, k posunu čtecího rámce ve většině případů nedojde. Většina případů změn v rámci čtecího rámce ústí v doménu proteinu navíc, ne ve změněnou doménu [34].

Bylo zjištěno, že u transmembránových proteinů s jedním helixem procházejícím přes membránu není 85 % sekvencí kódujících tuto oblast přerušeno intronem. U proteinů se sedminásobnou transmembránovou doménou nebyla tato sekvence přerušena u 80 % těchto proteinů. Je zřejmé, že na celistvost transmembránových částí je vyvíjen velký selektivní tlak [35].

Tkáňově specifický alternativní sestřih umožňuje vznik proteinů s odlišnou funkcí. Rozdílný sestřih genu *fruitless* (*fru*) u *Drosophila melanogaster* určuje chování samců při namlouvání. Standardním sestřihem vznikne samice s patřičnou sexuální orientací a chováním. Při alternativním sestřihu dojde k vyvolání samčího chování a orientaci [36]. Alternativní

sestřih genu pro protein Fas vede ke vzniku membránové, nebo rozpustné formy s opačným účinkem na apoptózu [37]. Dalším alternativně sestřihovaným proteinem je lidský osteopontin, jehož jsou známy tři sestřihové varianty. Jejich výskyt má vliv na vývoj nádoru. Všechny tyto tři varianty a jejich role v organismu budou diskutovány níže. Gen pro kalcitonin se skládá z šesti exonů. Sestřihem tohoto genu za vzniku mRNA s prvními čtyřmi exony dojde ke vzniku proteinu regulujícího hladinu sérového vápníku. K tomuto sestřihu dochází v buňkách štítné žlázy. V případě alternativního sestřihu dojde ke vzniku mRNA s exony 1, 2, 3, 5 a 6. Vzniká neuropeptid příbuzný s kalcitoninem, k tomu dochází v nervové tkáni [38].

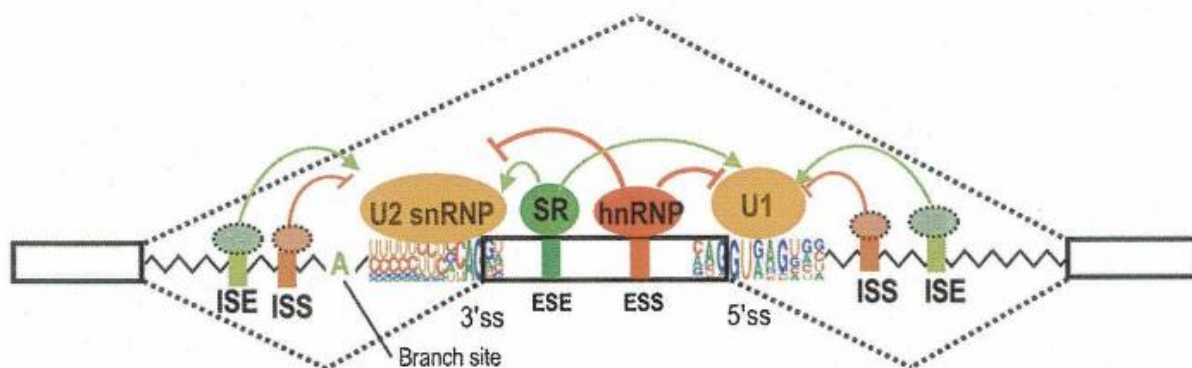
Inducibilní alternativní sestřih odpovídá na změnu vnějších podmínek. Například u savčího receptoru CD45, transmembránové tyrosinové fosfatasy, dochází ke vzniku proteinu se změněnými extracelulárními doménami vlivem aktivace T buněk [39].

Při trans sestřihu a alternativním trans sestřihu dochází k připojení exonu z jiné mRNA. Pro tento proces je potřebná SL RNA (spliced leader RNA), která tento proces umožňuje. U savčích buněk byl pozorován trans sestřih za vzniku buněčné/virové mRNA a virové/virové mRNA [40]. Veškerý pozorovaný trans sestřih v savčích buňkách byl doprovázen cis sestřihem (normálním sestřihem), je proto tedy pravděpodobné, že pozorovaný trans sestřih byl jen sestřihový šum [41].

Geneticky podmíněné nemoci jsou často spojené s bodovou mutací genomové DNA, přičemž tyto mutace jsou obvykle příčinou změny aminokyseliny v kódovaném proteinu, což vede k jeho změněné funkci a rozvoji daného onemocnění. Kromě toho se ale může jednat o mutaci v regulačním místě RNA, která pak vede k přeskočení exonu nebo jinému sestřihovému excessu [42], týká se to přibližně 15 % onemocnění podmíněných genetickou mutací [43].

Regulace sestřihu ještě není plně prozkoumána. Jsou známy některé mechanismy ovlivňující tento proces. K regulaci sestřihu dochází pomocí *trans* faktorů, proteinů, které rozeznávají místa v intronických a exonických částech mRNA (*cis* elementy), což vede k modulaci sestřihu. Název trans napovídá, že jde o faktory nenacházející se na mRNA. Naproti tomu *cis* elementy jsou součástí RNA [44]. Mohou fungovat jako enhancery, tedy sekvence

s pozitivním účinkem, nebo jako silencers, sekvence s negativním účinkem [42]. Celkově se tyto sekvence dají rozdělit na intronové a exonové enhancery (ESE, ESS) a silencers (ISE a ISS) [45] (viz obrázek 3, str. 20). Roli enhancerů plní SR proteiny, naproti tomu na silencerové sekvence se váží hnRNP [46]. Vlivem různé aktivity nebo množství těchto faktorů dochází ke vzniku odlišných proteinů během vývoje tkáně nebo napříč odlišnými tkáněmi [44]. Někdy se vyskytují v pre-mRNA pseudoexony, které jsou velmi zřídka zahrnuty do upravené mRNA. Téměř všechny exony obsahují ESE [47].



Obrázek 3 Schéma regulace sestřihu Obdélníky značí exony, zubatá čára introny. SR proteiny se váží na enhancerové sekvence a pozitivně modulují sestřih. Naproti tomu hnRNP se váží na sekvence silencerů a negativně modulují sestřih. Zkratka ss znamená sestřihové místo, Branch site místo s větvicím adeninem. Přerušované čáry naznačují možné výsledné spojení exonů. Upraveno dle [46].

Důležitými trans regulačními jednotkami jsou proteiny bohaté na arginin a serin (SR proteiny). Mají C-terminální doménu bohatou na aminokyseliny arginin a serin sloužící k protein-proteinové interakci s dalšími složkami spliceosomu. Této doméně předchází oblast bohatá na glyciny umožňující konformační pohyblivost [45]. Obsahují motiv rozpoznávající RNA, který slouží k vazbě na patřičné místo mRNA a RS doménu, jejíž fosforylace je důležitá pro specifickou vazbu na RNA [48].

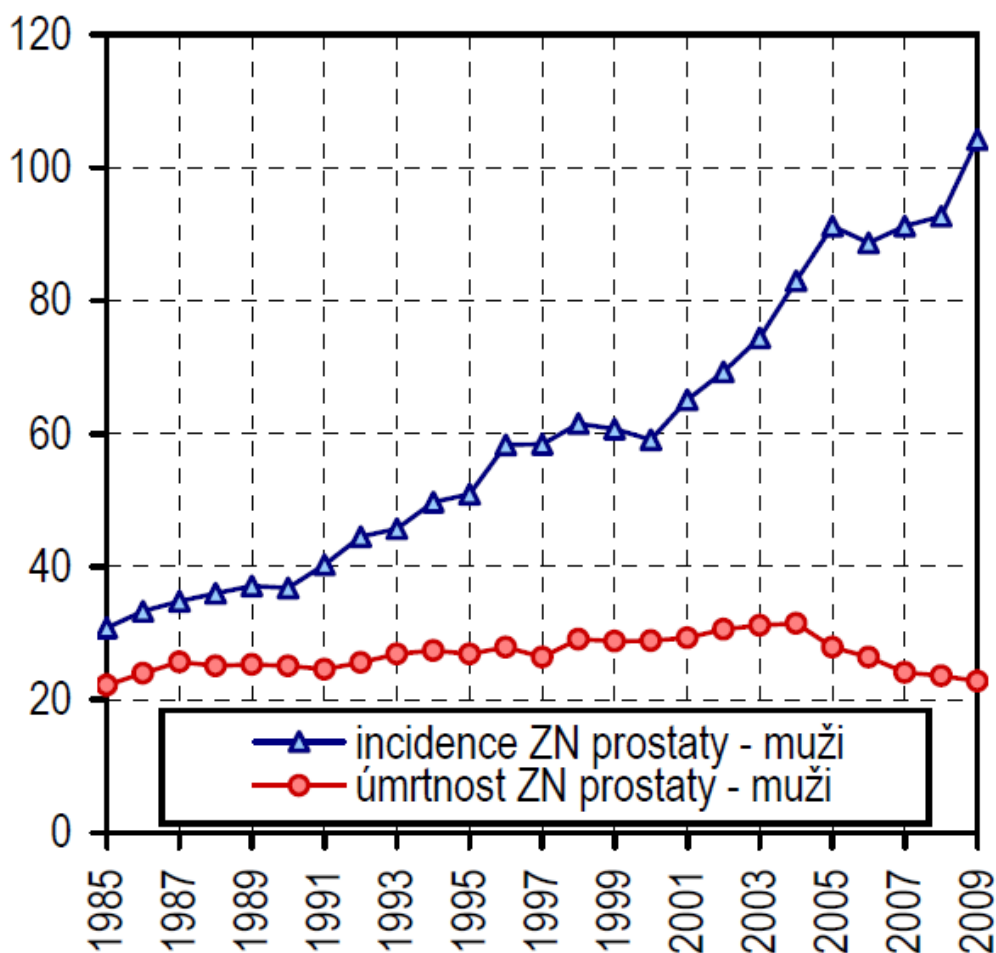
Dalšími významnými proteiny účastnicími se regulace sestřihu jsou „SR related proteins“. Nepatří mezi nezbytné (esenciální) sestřihové faktory, ale mezi specifické sestřihové regulátory [49]. Mají molekulovou hmotnost 30, 40, 55 nebo 75 kDa. Jednotlivé SR proteiny

mají zřejmě různou specifitu pro různé podtřídy mRNA a regulací množství SR proteinů v jednotlivých tkáních lze dosáhnout buněčně specifických sestřihových míst. Této teorii odpovídá pozorování změny sestřihového místa při změně hladin jednotlivých SR proteinů [45].

Bylo prokázáno, že poměr faktorů účastnících se sestřihu se v tkáních potkanů liší [50]. Aktivita SR proteinů i hnRNP částic je ovlivňována fosforylací, tudíž k regulaci děje může docházet i vlivem proteinkinas účastnících se fosforylace těchto molekul, a tím je propojena regulace alternativního sestřihu s extracelulárními signály. Na alternativní sestřih mají největší vliv tkáňově a vývojově specifické faktory. Aktivace RNA polymerasy II způsobuje asociaci SR proteinů s mRNA [42]. Rozdílné promotory také ovlivňují sestřih [51].

Význam alternativního sestřihu v rakovině prostaty

Rakovina prostaty je nejrozšířenější zhoubný nádor mužů v České republice od roku 2005, pokud se neberou v úvahu méně závažná maligní onemocnění patřící do kategorie „Jiný zhoubný novotvar kůže“. Úmrtnost na tento nádor je díky povaze onemocnění relativně nízká, v posledních letech se pohybuje kolem jedné čtvrtiny nově diagnostikovaných případů. Incidence mezi lety 2008 a 2009 vzrostla o 13 %, což je v souladu s pozorovaným trendem vzrůstajícího výskytu tohoto onemocnění již od devadesátých let. Naopak míra úmrtnosti stagnuje či klesá, jak je patrné z grafu na obrázku 4 na straně 15. V roce 2009 bylo v ČR nově diagnostikováno 119,5 případů na 100 000 mužů [52]. V Evropě byla v roce 2008 podle Světové zdravotnické organizace rakovina prostaty třetím nejčastějším smrtelným nádorovým onemocněním mužů. Více úmrtí způsobily již jen nádory dýchací soustavy či střeva a konečníku [53].



Obrázek 4 Incidence a úmrtnost mužů v Evropě. Z grafu je patrný rozdíl mezi incidencí a počtu úmrtí na rakovinu prostaty. Je však nutné vést v patrnosti rozmanitost povahy onemocnění mezi jednotlivci a tedy zobecnění výsledků. Po zavedení PSA screeningu v devadesátých letech došlo k mohutnému nárůstu incidence, úmrtnost zůstává na stejné úrovni. Převzato z [52].

Bohužel primární prevence tohoto onemocnění není možná, protože jediný známý rizikový faktor je věk a afroamerická etnicita [54]. V současné době se většina nových případů odhalí pomocí měření hladiny prostatického specifického antigenu (PSA) v krvi. Doporučená věková hranice prověřování je 40 let. Prostatický specifický antigen je serinová proteasa exprimovaná prostatickými epiteliálními buňkami. PSA je orgánově specifický, ne však nádorově specifický. Hladina tohoto proteinu v krvi je tedy zvýšená nejen při karcinomu prostaty,

ale také při nemaligních onemocněních prostaty jako jsou benigní prostatická hyperplazie nebo prostatitida. Nicméně s rostoucí hodnotou PSA se zvyšuje pravděpodobnost nálezu histologicky potvrzeného karcinomu prostaty. Při koncentraci 3-4 ng/ml PSA v séru je 30 % šance výskytu nádoru [55], [56].

PSA se v krvi vyskytuje ve dvou formách, kovalentně inhibované (většinou alfa 1-antichymotrypsinem) a aktivní, tzv. volné formě. Ukázalo se, že sledování poměru hodnot koncentrací těchto jednotlivých forem zlepšuje rozlišení mezi benigní hyperplazií a karcinomem při vysoké hladině PSA a negativním vyšetření pohmatem (popsané níže). Při zvýšené hodnotě poměru volného k celkovému množství PSA je nižší šance výskytu nádoru [57], [55].

Na základě zvýšené koncentrace PSA nebo pozitivního nálezu po vyšetření prostaty pohmatem (tzv. digital rectal examination, DRE) se přechází k vyšetření biopsií. Při tomto zákroku je odebrána tkáň z různých míst orgánu. Odebraná tkáň je histologicky vyšetřena na přítomnost karcinomu, u pozitivního nálezu je dále stanoveno Gleasonovo skóre (GS). Gleasonovo skóre je standard pro hodnocení adenokarcinomů vzorků získaných z biopsie nebo operace a popisuje míru dediferenciace buněk na základě změn jejich morfologie. Nabývá hodnot 2 až 10, 2 je nejméně agresivní, 10 nejvíce [58], [55].

Klíčový pro další zacházení je výsledek histopatologického vyšetření odebrané biopsické tkáně, pokud se u pacienta neprokáže přítomnost karcinomu, pacient nepodstupuje další léčbu, poměrně často ale bývá později biopsie opakována, někdy s pozitivním nálezem.

Zatímco pozitivní diagnózu lze stanovit poměrně spolehlivě, prognózu nikoliv, a proto se pouze odhaduje pomocí klinicky odvozených Partinových [59] a Hanových [60] tabulek na základě hodnot GS vzorků z biopsie, PSA a výsledku DRE. Partinovy tabulky slouží k odhadu lokální pokročilosti nádoru (tzn., jestli je ještě ohraničený uvnitř prostaty, či zda již prorůstá obalem do okolní tkáně, což má vliv na způsob provedení operace), kdežto Hanovy tabulky slouží k predikci návratu rakoviny do deseti let po chirurgickém zákroku [60].

V případě dobré prognózy, lokalizovaného nemetastazujícího nádoru se přistupuje k chirurgickému odebrání celé prostatické žlázy (radikální prostatektomie, RAPE), obou semenných váčků a potřebné množství okolní tkáně. Často je při tomto zákroku rovnou prováděno i odebrání lymfatických uzlin pánevního dna. Jedná se o invazivní zásah s celou řadou vedlejších následků, který má smysl pouze tehdy, pokud vede k úplnému uzdravení. Bohužel u velké části pacientů dochází po operaci k biochemické progresi (znovuobjevení PSA v krvi) a následné klinické progresi (objevení klinických obtíží). Stejně tak se odhaduje, že až třetina pacientů by nemusela být operována, protože by nemoc postupovala tak pomalu, že by jim během života nezpůsobila vážné obtíže [59]. Znalost jakýchkoliv nových prognostických markerů by tedy výrazně zlepšila výběr pacientů pro RAPE a snížila počet zbytečných zákroků.

Při horší prognóze, metastazujícím nádoru a krátké očekávané době života se přistupuje k léčbě chemoterapeutiky, ozařováním a hormonální léčbě, zvlášť nebo kombinovaně. Žádná z těchto léčeb nepředstavuje naději na definitivní vyléčení. Hormonální terapie obvykle představuje poslední možnost zpomalení nemoci. Buňky karcinomu jsou závislé na androgenech, bez něhož je indukována apoptóza. Terapie spočívá ve snížení hladiny dostupných androgenů. To se provádí buď chemicky, nebo chirurgicky odstraněním varlat, nebo oběma způsoby, protože malou část androgenů produkují nadledvinky. Léčbu provází řada vedlejších účinků včetně změn chování, a navíc se obvykle během několika let vyvine rezistence, takže je toto řešení jen dočasné a odkládající finální stadium nemoci o dva až tři roky.

Kromě klinicky používaného PSA je známá celá řada nadějných diagnostických či prognostických markerů karcinomu prostaty [61]. Protože se zatím neprokázalo, že by jediný marker mohl přinést výrazné zlepšení, možným řešením svízelné situace s určením prognózy je současné využití více markerů. Také nové markery produkované pouze metastazujícími buňkami, či jinak stadiově specifické, by velmi napomohly při rozhodování o další léčbě. Faktory umožňující buňkám metastazování by navíc byly dobrými

terapeutickými cíli. Z těchto skupin zatím vypadají slibně níže popsané proteiny osteopontin, androgenový receptor a prostatický specifický antigen a jeho sestřihové varianty.

Osteopontin

Osteopontin je negativně nabitý protein tvořený 300 aminokyselinami [62]. Patří do rodiny SIBLING (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein), váže vápníkové ionty, je asociovaný s mezibuněčnou hmotou [63]. Ve zdravé tkáni je exprimován osteoblasty i osteoklasty, buňkami umožňujícími přestavbu kostní tkáně [64], [65]. Z fyziologických procesů se účastní odbourávání kostní tkáně, hojení ran, přestavby tkání, imunologické odpovědi a vaskularizace [63]. Řízení odbourávání kostní tkáně pomocí parathormonu je závislé na osteopontinu [66]. Dále je také exprimován v makrofázích, endoteliálních buňkách, hladké svaloviny a epiteliálních buňkách. Je sekretován změněnými maligními epiteliálními buňkami [67]. Podléhá alternativnímu sestřihu, je posttranslačně modifikován, fosforylován a glykosylován [62]. Díky posttranslačním modifikacím mohou vznikat formy s odlišnými funkcemi [63]. Obsahuje RGD sekvenci (aminokyseliny argininu, glycinu a asparagové kyseliny) pro vazbu buněk pomocí integrinových receptorů, má dvě heparin vázající domény, může být vázán přes isoformy CD44 receptoru, ne přes CD44 samotný [62], jehož exprese zvyšuje [63].

Extracelulární matrix se skládá z proteinů a polysacharidů exkretovaných buňkami. Obsahuje adhesivní a antiadhesivní molekuly jako fibronectin, laminin, vitronectin, strukturní molekuly kolagen a elastin, a proteoglykany. Interaguje s receptory na povrchu buněk, které zpracovávají extracelulární signály přijímané těmito receptory a odpovídají na ně změnou genové exprese potažmo růstem a diferenciací [68].

Přilnutí buňky na extracelulární matrix mění hladinu cyklinu D1, cyklin E dependentní kinasy 2 a Rb proteinu. Při odpojení buňky dojde k jejímu zastavení v G1 arresu a následné apoptóze. Smrt buňky odtržením od extracelulárního matrixu se nazývá anoikis. Pokud je buňka rezistentní vůči apoptóze a selže mechanismus kontroly množství a umístění buněk, může dojít k jejímu růstu nezávisle na ukotvení [69].

Osteopontin hraje roli v ukotvení buněk tím způsobem, že váže buněčné integriny a sám se váže na fibronectin matrixu. Tím zprostředkovává kotvící vazbu [70]. Váže se na různé druhy buněk, na osteoklasty, osteoblasty, transformované fibroblasty a další [71]. Tvoří vazbu s hydroxyapatitovými krystaly a zároveň s buněčným povrchem pomocí integrinů, které se váží na RGD sekvenci. Tím dochází k připojení osteoklastů na povrch kosti [72]. Na koncentraci vápenatých kationtů je velmi citlivá konformace osteopontinu. Její změnou je ovlivněna schopnost vazby integrinu, který v závislosti na povaze ligandu vydává rozdílné signály buňce pomocí změny koncentrace intracelulárního Ca^{2+} [73].

Alternativní sestřih osteopontinu

Vlivem alternativního sestřihu vznikají kromě celé formy OPN-a (z celkem 7 exonů) také varianty s chybějícím exonem 5, OPN-b, a s chybějícím exonem 4, OPN-c [74]. Každá z variant se vyskytuje v jiné míře v jiných tkáních a stádiích rakoviny. Zvýšený alternativní sestřih způsobující vznik variant OPN-b a OPN-c provází vývoj rakoviny žaludku a tím velmi zvyšuje jeho agresivitu [75].

Metodou kvantitativní polymerázové reakce bylo zjištěno množství osteopontinové mRNA ve vzorcích prostatických tkání [76]. Ve zdravé tkáni se OPN nachází v epitelálních buňkách. Rozdíl mezi jeho hladinami ve zdravé tkáni a benigní hyperplazii je malý. Množství osteopontinu roste s rostoucím Gleason score nádorů. Zvýšená hladina exprese osteopontinu také koreluje s dobou přežití, jeho hodnoty jsou tedy potenciálně využitelné pro prognostické účely a určení míry malignance, stejně jako Gleason score [77]. Množství OPN-c mRNA bylo v nádorové tkáni dvě stě krát vyšší než v hyperplazii. Tento velký rozdíl byl i potvrzen stanovením proteinu OPN-c v těchto tkáních pomocí specifické protilátky proti OPN-c. V porovnání využitelnosti variant osteopontinu a PSA k diagnóze vyšla nejlépe varianta s chybějícím exonem 4, tedy OPN-c. Předčila PSA ve specificitě i senzitivitě [76]. Výhodou OPN oproti Gleason score je, že Gleason score lze stanovit pouze histologicky, kdežto OPN lze analyzovat i v krvi a moči [78]. OPN-c stimuluje okolní nenádorové buňky k proliferaci a zřejmě podporuje transkripční cesty kritické pro patogenezi maligních nádorů prostaty.

Také zvyšuje aktivitu PI3 kinasové signalizace účinkující při vzniku nádoru a jeho progresi. V budoucnu by mohlo být možné využití varianty OPN-c jako cíle léčby rakoviny [76].

Schopnost migrace rakovinných buněk roste s rostoucí expresí variant v řadě OPN-a, OPN-b, OPN-c. Z testování *in vivo* bylo dokázáno, že OPN-b i OPN-c způsobují metastazování v jaterní tkáni, OPN-c ve větší míře [75].

Kvůli selektivnímu výskytu isoformy OPN-c v nádoru prsu je považován za selektivní marker a mohl by být klinicky využit pro popis progresu nádoru [79]. Alternativní translací vzniká sekretovaná a intracelulární forma, které se liší ve svých biologických funkcích v dendritických buňkách [80]. Sekretovaná forma interaguje s CD44 receptorem a různými integriny, reguluje vaskularizaci, imunitní odpověď a nádorovou progresi. Intracelulární forma reguluje pohyblivost buňky. Obě tyto formy, jak sekretovaná, tak intracelulární, mohou regulovat signální dráhu regulující buněčnou odpověď, každá jiným způsobem [63].

Androgenový receptor

Androgenový receptor je další z proteinů podléhajících alternativnímu sestřihu. Je to transkripční faktor, obsahuje ligand vázající doménu (LBD) a DNA vázající doménu (DBD) [81]. Patří do superrodiny jaderných receptorů [82]. Nejhojnější sérový androgen je testosteron. Ten je přeměněn na dihydrotestosteron, který se váže na AR [83]. Ten podlehně konformační změně, přejde z cytoplasmy do jádra a váže se na androgen responsivní elementy v genomové DNA [84]. Genová exprese závislá na androgenovém receptoru vede k rozličným projevům v závislosti na druhu buňky, například může začít produkovat proteiny nutné pro přežití buňky a geny podněcující zahájení buněčného cyklu [85].

Hormonální léčba rakoviny prostaty spočívá ve snižování hladiny testosteronu. Tato terapie potlačuje růst nádoru, ale ten se v určitém stádiu stane androgen-nezávislý. K tomuto může dojít několika způsoby [81].

První zahrnuje změny v AR vlivem mutací v genu pro AR, kvůli kterým nakonec může jako ligand fungovat i netypická molekula jako estrogen, nebo jeho amplifikací [86]. Amplifikace

genu je častý nástroj nádoru, díky kterému má nádorová buňka kopie genu, které se mohou nacházet jako repetice uvnitř chromozomu nebo jako extrachromozomální jednotky. Amplifikace je doprovázena overexpresí genu [87]. Tyto změny nejsou příliš časté [81]. AR funguje jako seberegulační faktor, který po navázání na svůj gen zvyšuje svou produkci [88].

Druhý způsob postihuje většinu pacientů, u kterých se neobjeví mutace ani amplifikace genu pro AR. Androgenově nezávislé buněčné linie exprimují více HER-2/neu receptorů pro tyrosin kinasu. Tento receptor pak aktivuje dráhu androgenového receptoru bez přítomnosti samotného androgenu nebo při jeho nízké koncentraci superaktivací dráhy. Podobně je tomu i u progesteronových a estrogenových receptorů, které mohou být aktivovány epidermálním růstovým faktorem a dalšími faktory jako insulinu podobnému růstovému faktoru 1, který je blokován antagonistou androgenů casodexem. Zvýšená hladina insulinu podobného růstového faktoru 1 předpovídá risk vzniku rakoviny prostaty. Přesný mechanismus celé signální dráhy při androgenově nezávislém nádoru není ještě znám [89].

Další mechanismus přechodu na na androgenu nezávislejší růst je změna v signálních drahách. Dojde k přemostění této dráhy jinou, čímž se tato stává irelevantní a nemá již dále na vývoj nemoci vliv. Bcl-2 je protein regulující apoptózu, inaktivuje protein MAC, který po začlenění do mitochondriální membrány propouští cytochrom C z mitochondrie do cytoplasmu. Buňky exprimující Bcl-2 jsou rezistentní vůči apoptóze. Ve zdravé prostatě je Bcl-2 exprimován v epitelu, v bazálních epitelálních buňkách. Pomocí monoklonální protilátky byl detekován Bcl-2 v prostatických nádorových buňkách nezávislých na androgenech [90]. Terapeutickým cílem by mohl být komplex Bcl-2 s proteinem Bax, který je pozitivní modulátor apoptózy [91].

AR podléhá alternativnímu sestřihu za vzniku upravených variant. Žádná z nich není zahrnuta v terapii pacientů. Alternativně sestřižený gen, ze kterého vznikne androgenový receptor bez ligand vázající domény, spouští signální kaskádu stejnou jako plná varianta AR, ale bez nutnosti vazby ligandu [92]. Ve tkáni pacientů, u nichž selhala hormonální terapie, bylo detekováno zvýšené množství mRNA i proteinů převážně dvou variant AR (AR/V7 [93]

a AR/V1 [94]) s chybějící ligand vázající doménou díky stop kodonu za DNA vázající doménou. Exony 4-8 kódují ligand vázající doménu, exony 2 a 3 DNA vázající doménu [93].

Hladiny variant V1 a V7 jsou zvýšené v kostních metastázách kastraci rezistentní rakovině prostaty ve srovnání se vzorky z pacientů hormonálně neovlivněných [95]. Na zdravého jedince nemají varianty AR takový vliv jako u kastrovaných jedinců, kterým poskytují značnou výhodu v růstu nádoru [96]. Rozdíly v genové expresi jednotlivých variant by se daly využít jako biomarkery pro stanovení nádorů exprimujících varianty AR, kterým by klasická léčba cílená na ligand vázající doménu AR nepomohla [97].

PSMA jako marker

Oba výše uvedené proteiny se dají využít jako diagnostické ukazatele stavu pacienta. Dobrý marker musí být orgánově specifický a specifický vůči maligním procesům. Musí být schopný odrazit i malé množství těchto dějů už v raném stadiu, jeho parametr musí korelovat s velikostí nádoru. Toho se docílí použitím kombinací více markerů najednou. Proto je třeba dále hledat další proteiny, které by usnadnily léčbu a zabránily zbytečným zákrokům na pacientech, kteří by žili s vysokou kvalitou života, a naopak, identifikovat včas všechny pacienty, kteří nutně potřebují léčbu.

PSMA poskytuje výhodu tím, že je to membránový protein, není sekretovaný a je tedy potenciálně využitelný jako cíl pro léčbu nádorů cíleným doručováním léků přímo k poškozeným buňkám. Na využití a vývoj různých látek specificky se vázajících na PSMA se zaměřuje mnoho vědeckých skupin [98], [99], [100].

PSMA je 750 aminokyselin dlouhý membránový glykoprotein II typu [101] o celkové molekulové hmotnosti přibližně 110 kDa tvořící homodimer [102], [103], [104], [105]. Jedná se o dinukleární zinkovou metalopeptidasu, jejíž systematický název je glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII, E. C. 3.4.17.21.). Tento enzym v mozku štěpí neurotransmitter NAAG (N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát) na další neurotransmitery rozdílných vlastností N-acetylaspartát a glutamát, a tím moduluje nervový přenos na synapsi [106], [107]. Díky této enzymové aktivitě bývá nazýván také jako N-acetyl alpha linked acidic dipeptidase (Naaladase). V tenkém střevu pak hydrolyzuje gamaglutamylové vazby

ve folylpolyglutamátu a pravděpodobně se tak podílí na vstřebávání folátu z potravy. Odtud nese další název folátová hydrolasa [108]. Dále je exprimován v renálních tubulech ledvin, kde jeho funkce není zřejmá [109].

Zdaleka nejvyšší exprese PSMA je však v prostatě. Odtud plyne také název Prostatický specifický membránový antigen (PSMA) který používáme v této práci [110]. PSMA je exprimována především v normální, nádorové i metastazující prostatické tkáni [111], [112], [113], [114]. Některé studie ukazují růst hladiny PSMA během vývoje karcinomu prostaty a tvorby metastáz [115]. Biologická funkce PSMA v prostatě je neznámá, spekuluje se například o možné receptorové funkci [116]. Na PSMA je cílená monoklonální protilátka ProstaScint. Váže se na nádorovou tkáň a metastázy. Díky tomu, že je radioaktivně značená, je ji možné využít pro cílení, tedy jako zobrazovací techniku [117].

N-koncová část proteinu dlouhá 19 aminokyselinových zbytků je situovaná do buňky, na ni navazuje transmembránová část z 22 aminokyselinových zbytků. Zatímco neexistuje experimentálně určená struktura pro celý protein, tak pro jeho extracelulární část existuje celá řada krystalograficky určených struktur a víme proto, že se skládá ze tří domén: proteasové, apikální a helikální. Proteasová doména je tvořena aminokyselinovými zbytky číslo 56-116 a 352-591, apikální 117-351 a helikální je ze zbytků číslo 592-750. V prostorové výduti se nachází vázané dva zinkové ionty. Do této oblasti se váže substrát. Apikální doména se skládá ze dvou β skládaných listů, tří α helixů a jedné helikální otočky, tvoří stěnu substrát vázající dutiny. Proteasová doména se skládá z jedenácti α helixů a osmi β skládaných listů. Helikální doména je složená ze šesti α helixů, spojuje monomery v dimer. Celková struktura proteinu je podobná struktuře transferinového receptoru [118], [119].

Gen kódující GCPII se nazývá *FOLH1*, nachází se na 11. chromozomu na pozici 11p11-p12, má 19 exonů a 18 intronů [102].

Alternativně sestřižené Varianty PSMA objevené pomocí RT PCR v mRNA

Přehled dosud známých sestřihových variant je uveden na obrázku 5 na straně 32. PSM⁺ je první nalezená varianta PSMA, oproti které jí chybí 266 nukleotidů na 3' konci prvního exonu

kódujících intracelulární a transmembránovou část. Hypotetický protein PSM⁺ má 693 aminokyselin a molekulovou hmotnost 78 kDa [120], je zkrácený o intracelulární a transmembránovou část. Tím pádem by vzhledem k absenci signálního peptidu byl hypotetický protein PSM⁺ neglykosylovaný a lokalizovaný v cytosolu. Ve zdravé prostatické tkáni je převládající formou PSM⁺ mRNA, naproti tomu v nádorové tkáni je více PSMA mRNA. V BPH je množství obou variant přibližně stejné [120]. O využití poměru PSMA:PSM⁺ mRNA se uvažovalo jako o nádorovém indexu k diagnostickým účelům.

Protein PSM⁺ byl izolován, je ale o dvě aminokyseliny kratší na N-konci, než konstrukt předpovězený podle PSM⁺ mRNA. Protein PSM⁺ byl exprimován v buněčné linii odvozené z nádoru lidské prostaty metastázujícího do lymfatické uzliny. Expres tohoto proteinu byla nižší než exprese PSMA. Spojitost mezi PSM⁺ mRNA a PSM⁺ antigenem je sporná, protože PSM⁺ mRNA chybí signální sekvence pro posttranslační úpravy, ale nalezený protein je glykosylovaný [121], [122].

Varianta PSM-C má zkrácený první exon oproti PSMA mRNA stejně jako PSM⁺ mRNA. Tento exon následuje inserce exonu dlouhého 133 nukleotidů [123].

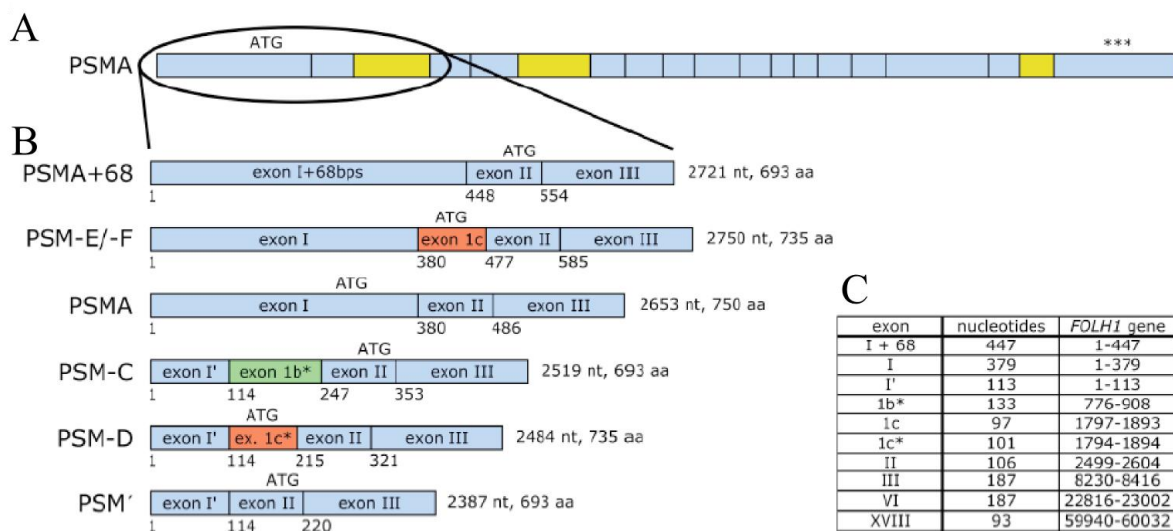
Varianta PSM-D má stejný první exon jako varianta PSM-C a PSM⁺ mRNA. Na něj navazuje inserce nového exonu dlouhého 101 nukleotidů [123].

Varianta PSM-E se od PSMA liší insercí po prvním exonu. Tento vložený exon je téměř identický jako vložený exon varianty PSM-D. Oproti PSMA chybí PSM-E 93 nukleotidů (v GCPII nukleotidy číslo 2232-2324, jde o delecí exonu 18). PSM-E mRNA byla nalezena jen v prostatických nádorech a buněčných liniích od něj odvozených, ne v ostatních nádorech. Varianta PSM-F se od PSM-E liší přítomností exonu 18. [124].

PSM-D mRNA je více exprimována v kostních metastázách a lymfatické uzlině než v primárním nádoru [123]. Rozdíl v expresi PSM-E mRNA mezi benigní hypertrofií a nádorem je výrazný [124].

Pomocí PCR byly objeveny dvě delece v RNA kódující PSMA a jeho varianty, jde o delece exonu 6 [125] a exonu 18 [126]. Delece exonu 18 byly detekovány v RNA izolované z lidského tenkého střeva [127], mozku, jater a prostaty [126]. Potenciální protein vzniklý z varianty s delecí exonu 6 by měl být asociovaný s membránou, ale neaktivní kvůli porušené enzymatické a dimerizační doméně. Navíc u něj dochází k posunu čtecího rámce. Protein s chybějícím exonem 18 by neobsahoval část dimerizační domény která je důležitá pro enzymatickou aktivitu, také by tedy byl neaktivní [125]. Všechny výše popsané varianty jsou shrnuty na obrázku 5 na straně 32.

Některé publikované práce naznačují korelaci mezi konkrétními sestřihovými variantami genu PSMA a prognózou onemocnění. Proto jsme se rozhodli prostudovat sestřihové varianty PSMA v nádorové buněčné linii odvozené od karcinomu prostaty (LNCaP) a z primárních nádorů prostaty z pacientů.



Obrázek 5 Varianty PSMA

Obdélníky jsou znázorněny exony, ATG značí začátek čtecího rámce, *** konec. (nt= nukleotid, aa aminokyselina) Převzato z [128].

A) PSMA mRNA obsahuje 19 exonů, žlutě označené jsou exony 3, 6 a 18, které v některých variantách schází. B) Ve zvětšení jsou znázorněny odlišné první tři exony sestřihových variant, jejich názvy jsou vypsány na levé straně obrázku. Velikosti jednotlivých exonů jsou vypsány v tabulce C. Čísla v sekvenci prvních nukleotidů

exonu jsou vypsána pod začátkem exonů. Varianta PSM-E neobsahuje exon 18, tím se liší od varianty PSM-F. PSM⁺ se od PSMA liší pouze změněným prvním exonem.

C) V tabulce jsou uvedené velikosti exonů a jejich pozice v sekvenci *FOLH1* genu kódujícího PSMA.

Materiál

Přístroje

Lightcycler 480 Instrument II, Roche (CHE)

TissueLyser II, Qiagen (SRN)

Bioanalyzer 2100, Agilent (USA)

přístroj pro PCR: T-Gradient Thermocycler, Biometra (SRN)

spektrofotometr: NanoDrop 1000, Thermo Scientific (USA)

Dokumentační systém Quantum ST4, Vilber Lourmat (FRA)

horizontální agarosová elektroforéza:

zdroj MP-500P, Major Science (TWN)

aparatura B1A Owl Separation Systems, Inc. (USA)

vertikální polyakrylamidová elektroforéza: Sigma (AUS)

centrifugy: Biofuge Pico, Heraeus Instruments (SRN)

destičky LightCycler 480Multiwell Plate 96, Roche (CHE)

Chemikálie

RNAlater, Invitrogen (USA)

β -merkapttoethanol, Sigma Aldrich (CHE)

Akrylamid, Sigma Aldrich (CHE)

Agarosa, Invitrogen (USA)

50-500 bps marker, Qiagen (kat.č. 239025) (SRN)

200-10 000 bps marker, AscoProt

(kat.č. DMM004) (CZE)

SeaKem agarose, Lonza (CHE)

Tris, Promega (USA)

Glycerol, Penta (CZE)

Bromfenolová modř, Sigma Aldrich (CHE)

Coomassie Brilliant Blue G-250, Serva (SRN)

Dodecylsulfát sodný, Sigma Aldrich (CHE)

GelRed, Biotium (USA)
Sacharosa, Sigma Aldrich (CHE)
Kys. chlorovodíková, Lach-Ner (CZE)
Kyselina boritá, Sigma Aldrich (CHE)
Azid sodný, Penta (CZE)
EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová,
Lachema (CZE)
RLT pufr, Qiagen (SRN)
UPL Probe #58, Roche (CHE)
Sonda FAM-BHQ1, Generi Biotech (CZE)
Probe master mix, Roche (CHE)
Phusion polymerase, Finnzymes (FIN)

Primery

QAmpResF, Sigma Aldrich (CHE)
QAmpResR, Sigma Aldrich (CHE)
Var2F_N7, Generi Biotech (CZE)
Var8Fn, Generi Biotech (CZE)
FRTPSMA2, Generi Biotech (CZE)
FRTPSMD4, Generi Biotech (CZE)
FRTPSMC1, Generi Biotech (CZE)
RRTPSMA_H, Generi Biotech (CZE)

Pufry

vzorkový pufr: 40% (w/v) sacharosa; 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 0.02% NaN_3

10x TBE roztok: 107,78 g Tris, 55 g kys. boritá, 3,72 g Na_2EDTA , doplněné destilovanou vodou do 1 l, pH neupravované

Kity

RNeasyMini Kit, Qiagen (SRN)
SuperScript III Reverse Transcriptase, Invitrogen (USA)
QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen (SRN)

Metody

Izolace RNA z tkání

Vzorky karcinomu prostaty a BPH pocházejí od pacientů z Thomayerovy nemocnice podstupujících radikální prostatektomii. Experimenty a odběr tkání byly schváleny Etickou komisí při nemocnici Bulovka, pacienti podepsali informovaný souhlas. Po jejím provedení a histologickém vyšetření byly ze zbylé tkáně odebrány vzorky. Ihned poté bylo přidáno cca 0,5 ml roztoku *RNAlater* a následně byly zamraženy v -80°C , přičemž doba do histologického zpracování byla zkrácena na minimum. Z rozmražených vzorků bylo odříznuto 10-40 mg. Ke každému vzorku bylo přidáno 600 μl RLT roztoku a 6 μl β -merkaptoethanolu.

Vzorky byly homogenizovány v přístroji TissueLyser při maximálním výkonu po dobu 3 minut. Poté byly centrifugovány (600x g, 15 minut, 4°C). Následně bylo odebráno 580 μl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 580 μl 70 % ethanolu. V případě vzorku LNCaP byl navíc použit speciální homogenizátor QIAshredder pro účinnější homogenizaci. Bylo postupováno podle návodu výrobce pro purifikaci RNA ze zvířecích buněk RNeasy Mini Kit. Izolace ostatních vzorků byla provedena podle návodu na přípravu RNA ze zvířecích tkání od stejného výrobce. Během procedury došlo k navázání RNA díky vhodné koncentraci solí v roztocích na křemičitano-vou membránu. Eluce izolované RNA byla provedena 35 μl vody. Poté byl pro lepší výtěžek roztok znovu nanesen na kolonku a eluován. Koncentrace RNA jednotlivých vzorků byla změřena na spektrofotometru NanoDrop. Na Agilent Bioanalyzer 2100 byla zjištěna čistota a stupeň degradace RNA. Postup byl proveden podle návodu v Agilent RNA 6000 Nano Kit. Do jedné jamky byl nanesen RNA 6000 Nano Ladder (marker molekulových velikostí). Ke každému vzorku byl přidán RNA 6000 Nano Marker podle návodu. Celá práce byla provedena ve flowboxu v RNA místnosti, aby se předešlo kontaminaci a degradaci RNAsami.

Reverzní transkripce

Reverzní transkripce RNA na DNA byla provedena pomocí reverzní transkriptasy SuperScript III. Postup byl proveden podle návodu výrobce, přičemž nebyla přidána RNasa H. K přepisu byl použit primer oligo(dT) (1 μ M výsledná koncentrace), díky kterému došlo k přepisu celých cDNA včetně 3' konců. Podmínky transkripce jsou vypsány v tabulce 1 na straně 37. Množství použité RNA je uvedené v tabulce 2 na straně 37. Reakce byla provedena v PCR cykléru (T-Gradient Thermocycler).

Tabulka 1 Podmínky reverzní transkripce

Teplota	Čas
65°C	5 minut
Přidání 10 μ l cDNA Synthesis Mixu (dle protokolu)	
50°C	50 minut
85°C	5 minut

Tabulka 2 Množství izolované RNA použité pro reverzní transkripci

vzorek	ng RNA
Karcinom 1	400
Karcinom 2	2000
BPH 1	500
BPH 2	500
LNCaP	2000

Preamplifikace variant

Ze vzorků tkání pacientů a buněčné linie byly předpřipraveny varianty PSMA amplifikací cDNA pomocí PCR. Získaná cDNA obsahovala celé cDNA jednotlivých variant, aby bylo možné stanovit v jedné konkrétní variantě přítomnost delecí. Podmínky reakce jsou vypsány v tabulce 3 na straně 37. Složení reakcí je uvedeno v tabulce 4 na straně 37. Vždy bylo preamplifikováno všech pět variant z každé z pěti cDNA. Celkový objem reakcí byl 20 μ l. Výsledná koncentrace primerů byla vždy 1 μ M, koncentrace nukleotidů byla 200 μ M. Produkty reakcí byly analyzovány na 6% polyakrylamidovém gelu (poměr akrylamidu:bisakrylamidu byl 35,6:1), při napětí 120 V, 2 hodiny. Jako elektrodový puf bylo použito 1x TBE. Gel byl

ponořen do lázně s barvivem GelRed (100 000x), díky kterému bylo možné zobrazit proužky DNA na transiluminátoru.

Tabulka 3 Reakční podmínky amplifikace variant

Teplota	Počet cyklů	Čas
98°C	↑ 44x	30 vteřin
98°C		10 vteřin
teplota dosedání primerů (viz tabulka 4, str. 37)		20 vteřin
72°C		2,5 minuty
72°C		5 vteřin

Tabulka 4 Složení reakcí amplifikace variant

Cíl	T _m	Primer 1	Primer 2	Amplikon
PSM'	68°C	Var2F_N7	RRTPSMA_H	2150
PSMA	68°C	Var8Fn	RRTPSMA_H	2150
Var14	70°C	FRTPSMA2	RRTPSMA_H	2257
exon1c	70°C	FRTPSMD4	RRTPSMA_H	2226
exon1b	70°C	FRTPSMC1	RRTPSMA_H	2266

V každé reakci byly 4 µl 5x HF buffer, 0,4 µl deoxynukleotidů (10mM), 1 µl cDNA, 5,4 µl H₂O a 0,2 µl Phusion polymerasy. Zdůvodnění použití právě uvedených teplot dosedání primerů (T_m) je uvedeno ve výsledcích. Exon1c značí soubor variant, které obsahují na 5' konci právě tento alternativní exon. Stejně tak exon1b značí směs variant s exonem 1b na začátku sekvence.

Pro přečištění od případných nescifických amplifikací a primerů byly vzorky amplifikovaných variant naneseny na agarosový 0,75 % TBE gel (SeaKem Agarose). Gel byl obarven přidáním roztoku barvy GelRed (10 000x). Elektroforéza byla provedena při napětí 150 V po dobu 35 minut a při napětí 120 V po dobu 30 minut. Z gelu byly vyřezány kusy 0,5 cm nad a pod proužkem produktu (velikost kolem 2,5 kbps). Izolace z gelu byla provedena pomocí Qiagen Gel Extraction Kit dle návodu. Vzorek byl dvakrát pročištěn 500 µl roztoku QG buffer a eluce byla pro větší výtěžek provedena dvakrát 30 µl destilované vody (stejně jako u eluce po reverzní transkripci).

Absolutní kvantifikace sestřihových variant PSMA

Kvantifikace probíhala pomocí kvantitativního RT-PCR (Lightcycler 480 Instrument II, kombinace filtrů: excitace 465 nm, emise 510 nm) za pomoci FastStart Taq DNA Polymerasy,

a primerů, duálně značené hydrolyzační sondy (FAM-BHQ1) se zhášecem a fluoroforem, který po odštěpení fluoreskuje. Všechny pokusy s qPCR byly připravovány ve dvou flowboxech. V jednom se připravovaly primery, sondy, polymerasy a pufr, v druhém se pouze přidávala DNA. Množství fluorescence je úměrné množství DNA v reakci, tedy přibývá s exponenciálně přibývajícím DNA. Z vynesené fluorescence oproti počtu cyklů je odečteno C_p , ze kterého lze usoudit množství počáteční DNA. Všechny reakce byly provedeny třikrát. Koncentrace primerů v reakci byla vždy 1 μ M, sond 100 nM (pouze sonda #58 byla ve výsledné koncentraci 50 nM). Reakce byly prováděny v objemu 10 μ l. Pufr, nukleotidy a polymerasa jsou v mixu dodávaném výrobcem, který se do reakce dvakrát ředí.

V reakcích se použila cDNA získaná přepisem RNA, její množství je uvedené v tabulce 2 na straně 37. Stejně měření množství delecí bylo provedeno i na amplifikovaných variantách, které byly pro tento účel 10 000x ředěny. Výsledkem tedy bylo množství delecí v celkové RNA a množství delecí v jednotlivých variantách. Podmínky reakce jsou uvedené v tabulce 5 na straně 37. Rozpis primerů, sond a DNA je v tabulce 6 na straně 37. Byly provedeny beztemplátové negativní kontroly a pozitivní kontroly s plazmidy se zaklonovanými variantami pro všechny použité primery. Byly provedeny mezideštičkové kalibrace v rozsahu C_p 16-32. To znamená, že na každou destičku byl nanesen templát o koncentraci 10^3 a 10^5 kopií/ μ l. Pokus byl proveden paralelně třikrát.

Tabulka 5 Reakční podmínky

Teplota	Počet cyklů	Čas
95°C	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">↑</div> <div style="margin: 0 10px;">44x</div> </div>	3 minuty
95°C		10 s
64°C		30 s
72°C		30 s

Tabulka 6 Primery a sondy pro jednotlivé varianty

Varianta		Primer 1	Primer 2	Sonda	Amplikon
Var8b	s exonem 6	Var8bF_N1	6R	6TM	93
Var16	bez exonu 6	Var16F_N1	6R	6TM	86
Var8c	s exonem 18	Var8cF	7R	7TM	196
Var17	bez exonu 18	Var17F_N1	7R	7TM	170
AmpR		QAmpResF	QAmpResR	#58	62

Produkty reakcí byly pro kontrolu analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Vzorky smíchané se vzorkovým pufrem v poměru 5:1 byly nanесeny na 1,7 % agarosový TBE gel s barvivem GelRed (10 000x) pro vizualizaci DNA v UV světle o vlnové délce 365 nm. Separace byla provedena při napětí 150 V po dobu 30 minut. Na gelu byly proužky očekávané molekulové hmotnosti.

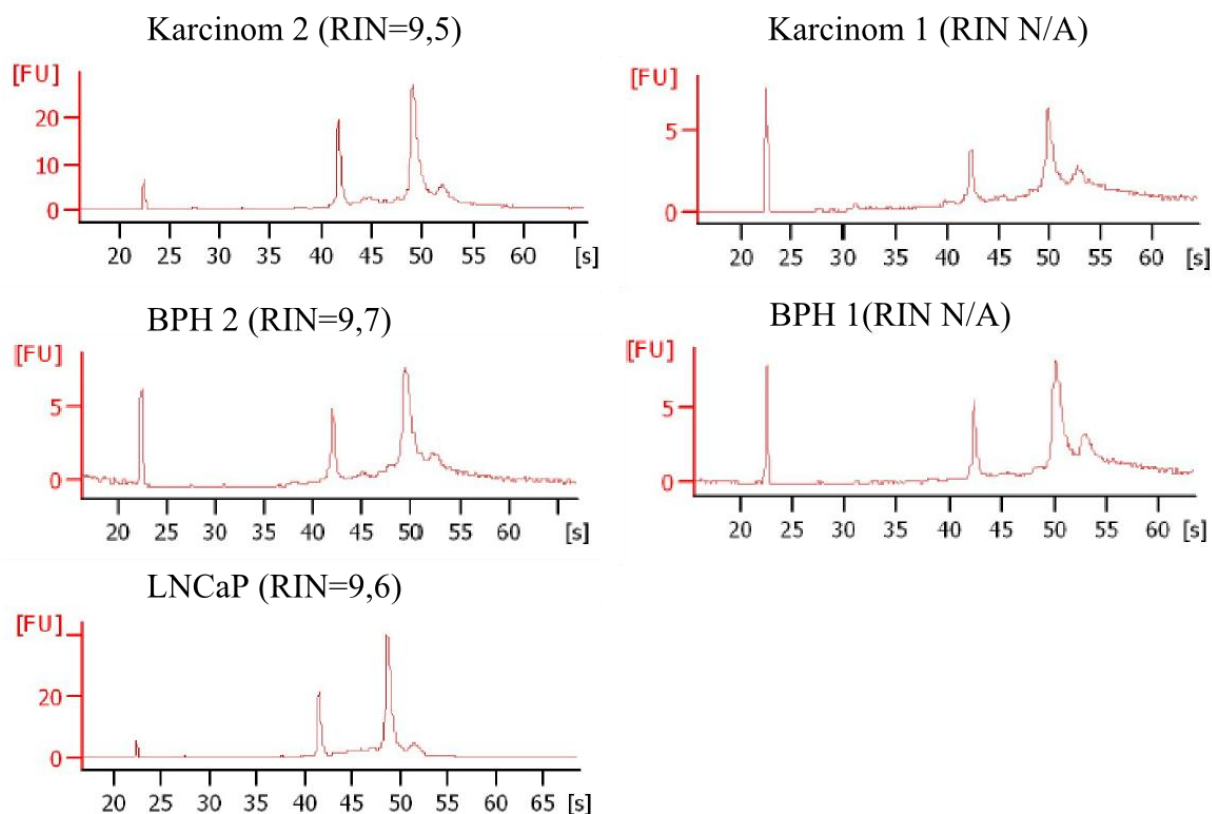
Výsledky

Množství získané RNA izolací z tkání a tkáňové kultury a její čistota je uvedena v tabulce 7 na straně 41. Koncentrace byla měřena spektrofotometricky. Poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm by měl být roven dvěma, poměr 260 nm a 230 nm ukazuje na znečištění vzorku organickými látkami nebo proteiny. Tato hodnota by se také ideálně měla pohybovat kolem dvou.

Tabulka 7 Čistota izolovaných RNA

Vzorek	ng/μl	ng	260/280	260/230
LNCaP	115	5750	2,02	1,69
Karcinom 1	94,6	4730	2,01	1,2
Karcinom 2	462	23100	2,08	1,93
BPH 1	90,7	4535	2,1	1,42
BPH 2	74,5	3725	2,02	0,79

Míru degradace ukazuje analýza RNA pomocí Eukaryote Total Nano 6000 Assay. Z obrázku 6 na straně 42 je patrné, že integrita RNA nebyla porušena. Hodnota RIN (RNA integrity number) je v případě zcela nedegradované RNA rovna 10. V některých případech hodnota RIN nebyla stanovena (N/A).



Obrázek 6 Elektroforeogram izolované RNA

Kapilární elektroforéza jednotlivých vzorků RNA (na ose x je vynesena čas, na ose y fluorescence v relativních jednotkách). Názvy vzorků jsou nad jednotlivými grafy, za názvem je v závorce uvedena hodnota RIN. První pík fluorescence zleva odpovídá přidanému markeru. Druhý pík je 18S rRNA a třetí, největší, pík je 28S rRNA. Na vzorku LNCaP je dobře patrné, že při nízké základní linii a absenci dalších píků je RNA neporušená, v případě, že je základní linie vzdálená od osy x, nebo se vyskytnou další píky, je RNA degradovaná.

Je známo, že varianty PSMA obsahují delece exonů 6 a 18 (viz obrázek 5, str. 32). Tyto exony jsou v sekvenci blíž 3' konci, naproti tomu nejprozkoumanější úseky jsou na 5' konci, kde se liší jednotlivé varianty. Z tohoto důvodu nebyly nikdy dány do souvislosti alterace na 3' konci a 5' konci. Pro tento účel nebylo možné použít qPCR se specifickými primery pro varianty a delece kvůli příliš dlouhému ampliconu. Proto bylo nutné nejprve získat cDNA celých variant. Jejich příprava byla provedena pomocí PCR s primery specifickými pro jednotlivé varianty.

Primery použité pro variantu 14, varianty obsahující exon 1c a varianty obsahující exon 1b bylo možné navrhnout tak, aby jejich celá sekvence byla zcela unikátní pro danou variantu či skupinu variant (daná varianta obsahuje unikátní sekvenci nukleotidů, kterou ostatní varianty neobsahují, viz obrázek 5, str. 32.). Proto se pro dosedání primerů použila teplota 70°C. Přehled T_m primerů je v tabulce 8 na straně 43. Při použití vyšší než teoretické teploty dosedání primerů lze předpokládat specifitu primerů, pokud k amplifikaci dojde. Varianty PSM' a PSMA žádnou takovou unikátní sekvenci neobsahují (Varianta PSM' obsahuje pouze zkrácený první exon oproti PSMA.). Jediné místo, kde se liší, se nachází na spojení dvou exonů, kam také tyto primery dosedají.

Specifické primery pro jednotlivé varianty byly úspěšně otestovány již dříve na Taq polymerase. Ta však neumožňuje amplifikaci tak dlouhých sekvencí, jako jsou celé varianty PSMA. Phusion polymerasa schopná amplifikace dlouhých úseků nemá 5'-3' exonukleasovou aktivitu, neštěpí tedy hydrolyzační sondu nutnou pro detekci v qPCR. Bylo nutné otestovat, zdali v jiném pufru použitém s Phusion polymerasou primery nedosedají nespecificky při používané teplotě dosedání primerů (T_m). Varianty PSMA a PSM' jsou si velmi podobné, liší se pouze v prvním exonu, a bylo by možné, že by primery dosedaly nespecificky právě na tu podobnou variantu.

Tabulka 8 Hodnoty T_m jednotlivých primerů dle Finnzymes (výrobce Phusion)

Primer	T _m (°C)
Var 2F_N7	65,35
Var 8Fn	68,57
FRTPSMA2	72,04
FRTPSMD4	70,7
FRTPSMC1	71,8
RRTPSMA_H	71,09

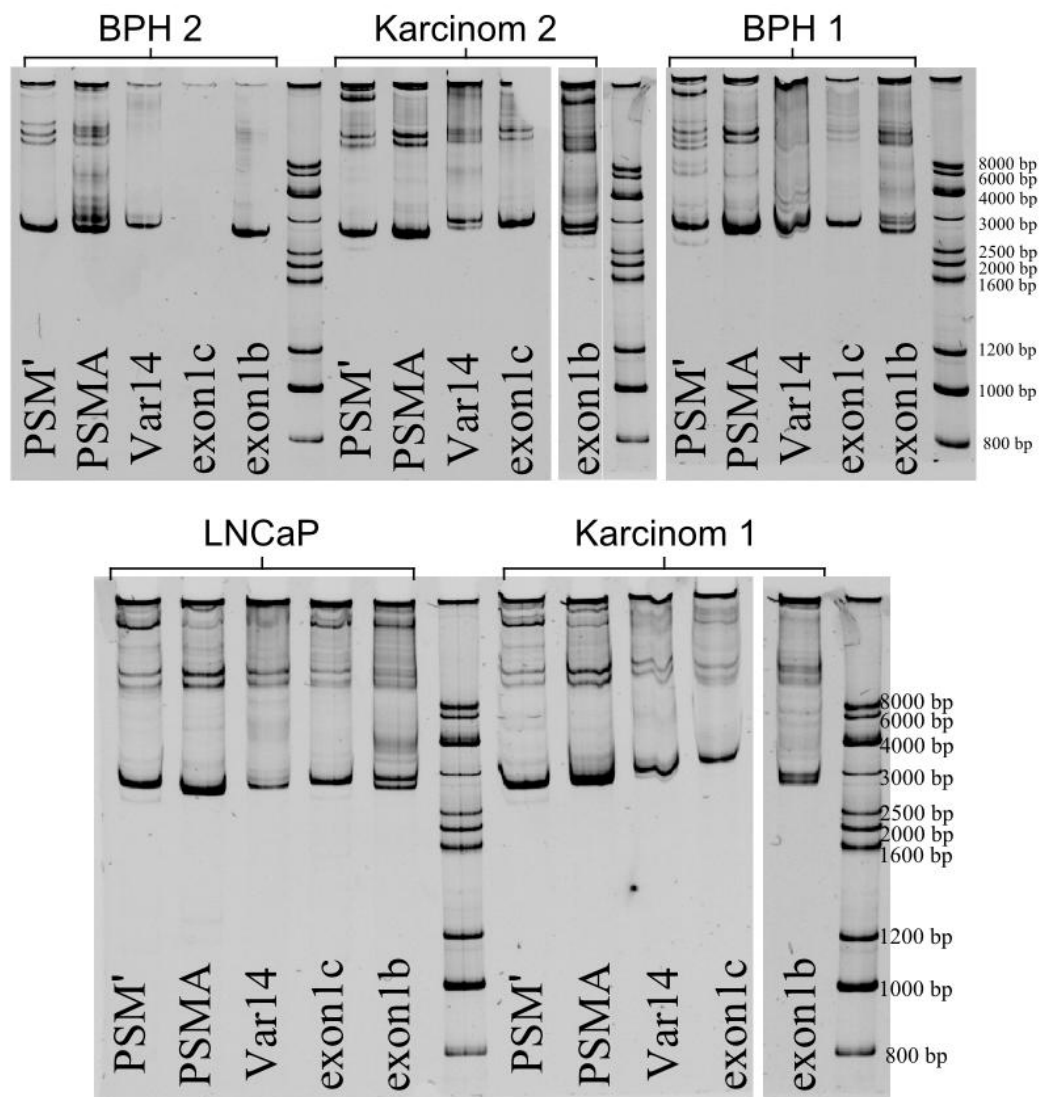
Kvůli tomu byl proveden qPCR, kde byla jako templátová DNA použita v prvním případě varianta zaklonovaná v plazmidu s příslušnými primery. S totožnými primery byla v druhém případě provedena reakce se směsí plazmidů se všemi ostatními variantami, které by daný pár primerů neměl amplifikovat, kromě té jedné. Beztemplátová kontrola sloužila jako negativní kontrola. Podle C_p bylo určeno, jestli dochází k nespecifické amplifikaci ostatních variant,

převážně podobné PSM' nebo PSMA. Teplota dosedání primerů byla 66°C. K nespecifické amplifikaci skutečně docházelo. Navíc byl proveden pokus, ve kterém byly za stejných podmínek amplifikovány varianty PSM' a PSMA z tkání. Ukázalo se, že jsou zastoupené přibližně ve stejném množství.

Pro zjištění, ve kterém cyklu se tvoří nespecifické produkty, byla provedena PCR reakce po dvaceti, třiceti a čtyřiceti cyklech. Phusion polymerasa neštěpí hydrolyzační sondu, proto bylo nutné nanést produkty reakce na agarosový gel, nikoliv provést pokus jako qPCR. Nespecifická amplifikace se tvořila již ve třicátém cyklu. Pro zjištění, kolikrát méně v produktu této reakce byly nespecifické amplikony, byly naředěny v různých koncentracích produkty reakce s primery a s odpovídající templátovou DNA a naneseny na agarosový gel. Do vedlejší jamky byl pro srovnání nanesen neředěný produkt reakce se směsí templátových DNA. Ukázalo se, že nespecifických produktů je pouze desetkrát méně než specifických.

Pro zvýšení specifity byla provedena PCR s vyšší teplotou dosedání primerů, a to 68°C. Templátové DNA byly naneseny v různých koncentracích. Po nanesení produktů na agarosový gel bylo zjištěno, že stále dochází k nespecifickým amplifikacím, ale je jich již řádově méně než požadovaných produktů.

Produkty reakcí preamplifikace variant byly naneseny na polyakrylamidový gel. Ukázané polyakrylamidové gely (viz obrázek 7, str. 45) slouží jen k analytickým účelům. Pro další použití byly varianty přečištěny na agarosovém gelu. Po vyřezání byly vyizolovány pomocí Qiagen Gel Extraction Kit. S jedním plazmidem se zaklonovanou variantou bez deletovaného exonu byl proveden qPCR desítkové koncentrační řady. Pro další použití byla vybrána koncentrace s hodnotou Cp 20, tedy ředění 10 000x. Cp 20 byl vybrán z toho důvodu, že se tento bod nachází zhruba uprostřed kalibrační křivky, tedy v místě s nejvyšší přesností.



Obrázek 7 Polyakrylamidové gely s preamplifikovanými variantami ze vzorků Nad jednotlivými drahami jsou vypsány vzorky, ze kterých byly amplifikovány varianty (uvedené vertikálně u každé dráhy). Amplifikace variant byla úspěšná, na obrázku jsou patrné proužky o očekávané velikosti 2 500 bází (označené šipkou). U některých vzorků jsou tyto proužky dvojité. Tato dvojitost nebyla analyzována, ale je pravděpodobné, že jde právě o varianty s delecemi a bez delecí. Objem nanesených vzorků byl 3 μ l. Byl použit marker molekulových velikostí s rozsahem 200-10 000 bps (popsán po krajích gelů). Vzorky exon1b a 1c značí soubor variant obsahujících stejnou sekvenci na 5' konci, tedy exonu 1b a 1c.

Absolutní kvantifikace variant PSMA

Statistické zpracování standardů a kalibračních křivek

Koncentrace zásobního roztoku plazmidů byla měřena na přístroji NanoDrop, poté z něj byla připravena desítková ředící řada v destilované vodě, která sloužila jako kalibrační řada standardů pro qPCR. Plazmidy obsahovaly zaklonované kompletní cDNA variant s delecemi a bez delecí, tedy celkem 4 druhy plazmidů (s exonem 6, s exonem 18, s delecí exonu 6 a s delecí exonu 18). Tyto plazmidy byly dříve připraveny v naší laboratoři. Každý plazmid obsahoval kromě zaklonované varianty také gen pro ampicilinovou rezistenci. Množství DNA v koncentračních řadách plazmidů bylo stanoveno pomocí qPCR. Pro srovnání jednotlivých kvantifikací bylo stejně určeno i množství genu kódujícího β -laktamasu. Všechna měření byla provedena třikrát.

Bylo třeba matematicky upravit kalibrační křivky. Pro zmenšení chyby zanesené pipetováním a účinností amplifikace, byla hodnoty C_p trojic měření byly zprůměrovány. Průměry všech hodnot C_p pro β -laktamasu byly vyneseny do grafu v závislosti na logaritmu koncentrace. Tím se dosáhlo standardní křivky pro β -laktamasu s nejmenší chybou. Proložením přímkou se získala směrnice a posunutí. Následně byly vyneseny body každé ředící řady zvlášť. Směrnice a posunutí ampicilinové rezistence se od průměrné křivky lišily. Po vydělení směrnice průměrné křivky směrnici jedné křivky byla získána hodnota a . Od posunutí průměrné křivky rezistence se odečetlo posunutí jedné křivky vynásobené hodnotou a . Tím se získala hodnota b .

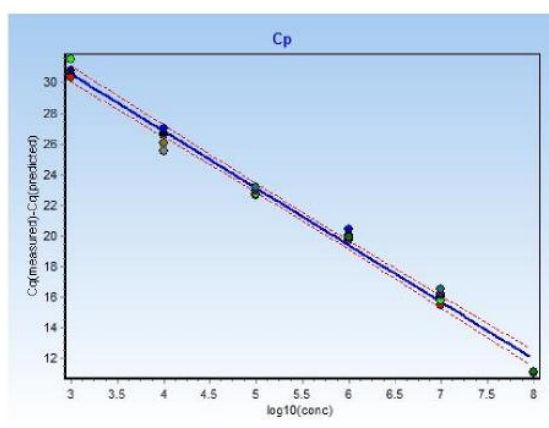
Nyní se vezmou v úvahu kalibrační křivky variant (viz obrázek 8, str. 48). Upravená směrnice varianty se získá vynásobením původní směrnice hodnotou a . Upravené posunutí se získá vynásobením původního posunutí hodnotou a a přičtením hodnoty b . Z této nové kalibrační přímkou se pak podle naměřených C_p spočítá logaritmus koncentrace templátu na začátku reakce.

V tabulce 9 na straně 48 jsou uvedeny směrnice a posunutí křivek ředících řad standardů měřených na qPCR. Pro porovnání jsou uvedeny hodnoty před kalibrací i po kalibraci (tedy upravené). Některé kalibrační řady byly měřeny postupně vícekrát na více destičkách.

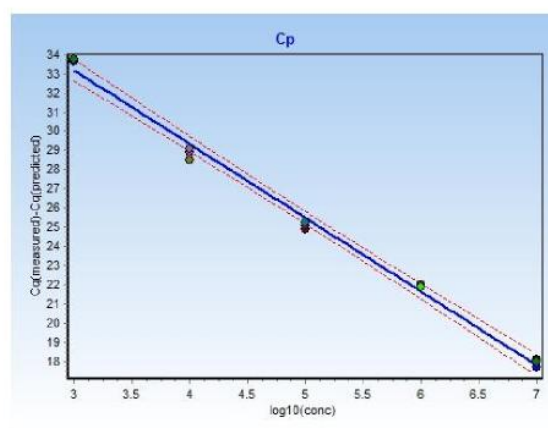
Tabulka 9 Směrnice a posunutí kalibrační křivky

Varianta	Původní		Po kalibraci		počet měření	počet bodů v kalibrační přímce
	směrnice	posunutí	směrnice	posunutí		
Var8b	-3,719	41,713	-3,809	41,908	2	6
Var8c	-4,020	43,655	-3,838	42,521	1	5
Var16	-3,849	44,732	-4,123	45,939	2	6
Var17	-3,872	42,886	-4,053	44,684	1	6

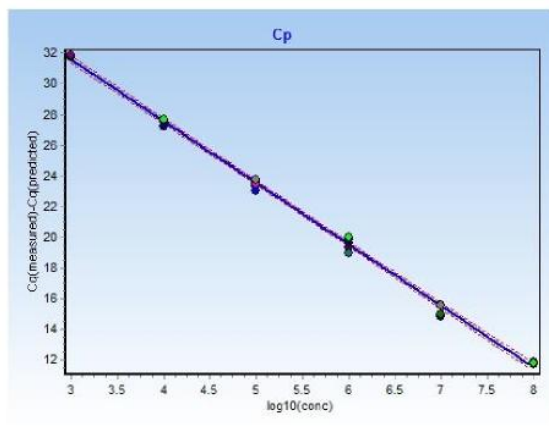
Var8b



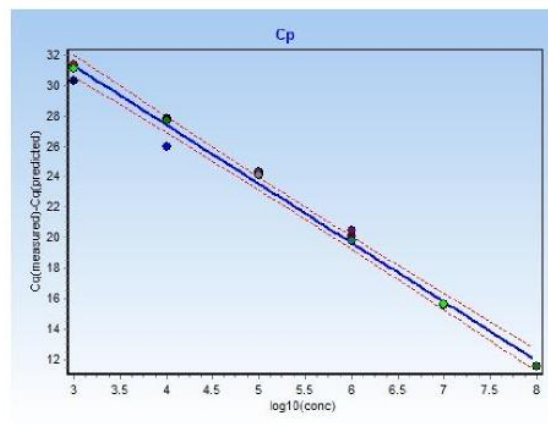
Var8c



Var16



Var17



Obrázek 8 Kalibrační křivky plazmidů s variantami s delecemi i bez nich

Na ose x je $\log c$ (počet kopií/ μl), na ose y Cp. Modrá křivka byla vytvořena proložením přímkou všemi body. Červené přerušované čáry vyznačují interval spolehlivosti 95 %.

Stanovení celkového množství delecí

Nejprve bylo provedeno stanovení delecí v celkové cDNA z buněk LNCaP a vzorků tkání prostat, tedy ve všech variantách najednou. V tabulce 10 na straně 49 jsou uvedené jednotlivé vzorky, Cp a množství delecí v procentech. Varianta, která nemá deletovaný 6. exon, je označena Var8b, varianty s deletovaným 6. exonem mají označení Var16. Varianty s 18. exonem jsou označeny Var8c, s deletovaným 18. exonem Var17.

Tabulka 10 Zastoupení delecí v celkové cDNA buněk LNCaP a vzorků tkání prostat (BPH=benigní prostatický hyperplazie).

Vzorek	Varianta	Cp	k/ng RNA	% delece	
LNCaP	Var8b	23,55	6606	4,86	exon 6
Karcinom 1	Var8b	25,78	3439	3,61	
Karcinom 2	Var8b	24,91	2895	1,38	
BPH 1	Var8b	27,10	1544	1,19	
BPH 2	Var8b	28,87	528	2,40	
LNCaP	Var8c	23,43	28703	14,95	exon 18
Karcinom 1	Var8c	26,67	9416	15,95	
Karcinom 2	Var8c	26,68	4675	18,21	
BPH 1	Var8c	28,53	3340	16,92	
BPH 2	Var8c	30,00	1471	20,05	
LNCaP	Var16	28,98	338		
Karcinom 1	Var16	31,74	129		
Karcinom 2	Var16	32,52	40		
BPH 1	Var16	34,97	19		
BPH 2	Var16	35,57	13		
LNCaP	Var17	25,63	5044		
Karcinom 1	Var17	28,67	1787		
Karcinom 2	Var17	28,40	1041		
BPH 1	Var17	30,37	680		
BPH 2	Var17	31,45	369		

Stanovení delecí v (preamplifikovaných) variantách PSMA

Stejně stanovení bylo provedeno i s preamplifikovanými variantami z nádorových tkání prostat a buněčné linie LNCaP. V tabulce 11 na straně 50 jsou uvedeny údaje o procentuálním zastoupení delecí ve variantách ze vzorků.

Tabulka 11 Množství delecí v preamplifikovaných variantách z benigní hyperplazie (BPH), nádoru a buněčné linie (LNCaP). Experimentální detaily jsou uvedeny v kapitole Absolutní kvantifikace sestřihových variant PSMA.

Vzorek	Varianta	Delece	součty počtu kopií s delecemi i exony	% delece
LNCaP	PSMA	exonu 18	740714	21,5
LNCaP	PSM'	exonu 18	352111	10,2
LNCaP	Var14	exonu 18	129408	43,1
LNCaP	exon1b	exonu 18	403583	12,5
LNCaP	exon1c	exonu 18	345979	21,1
BPH 1	PSMA	exonu 18	802703	14,8
BPH 1	PSM'	exonu 18	480219	16,7
BPH 1	Var14	exonu 18	491690	4,5
BPH 1	exon1b	exonu 18	503265	32
BPH 1	exon1c	exonu 18	237133	11,8
Karcinom 1	PSMA	exonu 18	706739	17,7
Karcinom 1	PSM'	exonu 18	731134	12,5
Karcinom 1	Var14	exonu 18	442691	17,5
Karcinom 1	exon1b	exonu 18	489317	32,6
Karcinom 1	exon1c	exonu 18	348658	27,2
LNCaP	PSMA	exonu 6	702713	2,8
LNCaP	PSM'	exonu 6	344815	14,3
LNCaP	Var14	exonu 6	90608	7
LNCaP	exon1b	exonu 6	385953	7,8
LNCaP	exon1c	exonu 6	311523	14
BPH 1	PSMA	exonu 6	620398	0
BPH 1	PSM'	exonu 6	362598	16,4
BPH 1	Var14	exonu 6	416861	0
BPH 1	exon1b	exonu 6	393185	0
BPH 1	exon1c	exonu 6	198602	0,1
Karcinom 1	PSMA	exonu 6	517511	3
Karcinom 1	PSM'	exonu 6	530708	13,1
Karcinom 1	Var14	exonu 6	335131	0
Karcinom 1	exon1b	exonu 6	387733	0,1
Karcinom 1	exon1c	exonu 6	318714	10,9

Jak je vidět, delece exonu 18 se vyskytuje ve větší míře než delece exonu 6. Tato delece také neničí čtecí rámec, na rozdíl od delece exonu 6. Jednotlivé varianty se vztahují relativně mezi sebou. Delecí je různé množství napříč variantami v různých typech tkání. Například v buněčné linii je velké množství varianty 14 s delecí exonu 18 (viz tabulka 11, str. 50). V benigní hyperplazii je ale v této variantě delece exonu 18 nejméně ze všech variant. Tyto odlišnosti by mohly ukazovat na změnu exprese variant v průběhu nádorového onemocnění.

V každé destičce byl přítomen triplikát vnitřního standardu o koncentraci templátové DNA 10^7 a 10^3 kopií/ μ l. Z naměřených C_p ze všech destiček byla spočítána směrodatná odchylka udávající odhad přesnosti a reprodukovatelnosti našich výsledků. V prvním případě vyšla 11,3 %, v druhém 0,7 %, což znamená velmi kvalitní data. Jako další kontrola přesnosti metody může posloužit porovnání součtu množství variant s exonem a bez exonu 6 se součtem variant s exonem a bez exonu 18 u jednotlivých variant v tabulce 11 na straně 50. Protože v obou případech byla použita templátová DNA o stejné koncentraci vzniklá amplifikací celé kódující cDNA, víme, že oba součty mají být shodné. Porovnáním těchto součtů dojdeme k tomu, že se hodnoty liší nanejvýše o přibližně 40%, často však o méně než 10%, což odpovídá očekávané přesnosti qPCR. Za povšimnutí stojí, že v tabulce 10 na straně 49 se tyto součty výrazně liší, což je způsobeno pravděpodobně klesající účinností reverzní transkripce se stoupající vzdáleností sekvence od 3' konce mRNA (a tím rostoucí vzdáleností od oligo dT primeru).

Diskuze

V teoretické části práce byl popsán mechanismus sestřihu, druhy intronů a vliv alternativního sestřihu proteinů na jejich úlohu v organismu. Tento jev může být jak fyziologický, například v případě proteinových hormonů, tak i nefyziologický, v případě procesu karcinogeneze. Hledání nových diagnostických a prognostických markerů se mimo jiné zaměřuje na sledování změn genové exprese specifických pro průběh nádorového bujení. Z tohoto důvodu se tato práce zabývá genem, který je exprimován ve zvýšené míře při nádorovém onemocnění prostaty. Změny v zastoupení jeho sestřihových variant by v případě korelace s rozvojem onemocnění mohly poskytnout důležitý nástroj pro včasné rozpoznání tohoto smrtelného onemocnění.

Cílem práce bylo stanovit množství dvou delecí, exonu 6 a exonu 18, v mRNA pocházející z genu kódujícího PSMA v několika biologických vzorcích. Kromě toho byla zkoumána souvislost četnosti výskytu těchto delecí s alternativním sestřihem PSMA mRNA na 5' konci.

Účinnost reverzní transkripce může být zásadním zdrojem chyb při kvantitativním RT-PCR avšak není stěžejní pro tento experiment. Došlo při ní k přepisu všech variant stejnou měrou pomocí oligo(dT) primeru. Vzhledem k tomu, že množství delecí je vždy vztahované na celkové množství varianty, tedy s delecí i bez ní, není třeba znát přesný původní počet kopií a účinnost přepisu.

Izolaci RNA z tkání je třeba provést co nejdříve po jejím získání. To ovšem není možné, proto je vzorek po dobu provedení histologických stanovení v nevhodných podmínkách pro uchování RNA. Vzorky byly konzervovány v co nejkratším možném čase, aby se zabránilo jejich degradaci a znehodnocení. Reverzní transkripcí se získá určité množství cDNA se stejným zastoupením variant, jako bylo v původním vzorku. Pro stanovení podílu variant s delecemi exonů 6 nebo 18 se nabízí jednodušší provedení práce. A sice použití specifických primerů pro danou variantu a unikátní místo v sekvenci odlišující variantu s delecí nebo bez ní. Ovšem takto dlouhý úsek by nebylo možné stanovovat při qPCR,

proto bylo nutné postupovat složitěji, v prvním kroku získat směs varianty s přítomným exonem i bez něj a až poté stanovit podíl deletované formy v této směsi.

Kvůli délce amplifikovaných úseků nebylo možné pro PCR použít dříve vyzkoušené podmínky s Taq polymerasou, ve kterých docházelo ke specifické amplifikaci jednotlivých variant. Použitá phusion polymerasa neštěpí hydrolyzační sondu, nedochází tedy v každém cyklu ke zvýšení fluorescence, a proto není použitelná pro qPCR. Kvůli změně enzymu a pufru bylo nezbytné otestovat znovu specifitu primerů, která se mohla lišit vlivem iontových sil způsobených jiným podílem solí v pufru.

Delece exonu 18 se vyskytuje ve větším množství než delece exonu 6. Je možné, že to souvisí s neporušeným čtecím rámcem v případě prve jmenované delece. Také je možné, že se v průběhu progresu nádoru mění exprese jednotlivých variant s delecemi. Delece exonu 6 je exprimovaná ve větším množství v nádorové tkáni a buněčné linii, než v benigní hyperplazii. Pro potvrzení této hypotézy a lepší statistické zpracování je třeba provést měření na větším počtu vzorků než je jeden od každého druhu tkáně. Fyziologický význam těchto delecí a případné využití pro diagnostiku nebo prognózu nádorů prostaty bude možné ověřit až po otestování většího množství vzorků pocházejících z pacientů v různých stadiích nádorového onemocnění.

Souhrn

Byla izolována RNA ze vzorků tkání prostat a buněčné linie odvozené od nádoru prostaty. Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA.

Z cDNA byly pomocí RT-PCR amplifikovány vybrané varianty PSMA z cDNA ze vzorku jedné benigní hyperplazie, jednoho karcinomu prostaty a jednoho vzorku buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty (LNCaP).

Metodou qPCR bylo stanoveno množství delecí exonu 6 a exonu 18 v celkové cDNA z jednoho vzorku LNCaP, dvou vzorků benigních prostatických hyperplazií a dvou vzorků karcinomů prostaty.

Seznam použité literatury

1. Archambault, J. and Friesen, J.D. *Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III*. Microbiol Rev, 1993. **57**(3): p. 703-24.
2. Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S. and Cramer, P. *A structural perspective of CTD function*. Genes & Development, 2005. **19**(12): p. 1401-1415.
3. Shatkin, A.J. *Capping of Eukaryotic Messenger-RNAs*. Cell, 1976. **9**(4): p. 645-653.
4. Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J.H., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., et al. *Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism*. Science, 2000. **288**(5466): p. 640-649.
5. Lehninger, A., *Lehninger Principles of Biochemistry*. fifth ed. 2008: W. H. Freeman & Co.
6. Furuichi, Y., Lafiandra, A. and Shatkin, A.J. *5'-Terminal Structure and Messenger-RNA Stability*. Nature, 1977. **266**(5599): p. 235-239.
7. Kozak, M. *How Do Eukaryotic Ribosomes Select Initiation Regions in Messenger-RNA*. Cell, 1978. **15**(4): p. 1109-1123.
8. Markowitz, R.B., Hermann, A.S., Taylor, D.F., He, L.Y., Anthonycahill, S., Ahn, N.G. and Dynan, W.S. *Phosphorylation of the C-Terminal Domain of RNA-Polymerase-II by the Extracellular-Signal-Regulated Protein-Kinase Erk2*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **207**(3): p. 1051-1057.
9. McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Poster, S., et al. *5' -capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II*. Genes & Development, 1997. **11**(24): p. 3306-3318.
10. McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G.H., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., et al. *The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription*. Nature, 1997. **385**(6614): p. 357-361.
11. Manley, J.L. *A complex protein assembly catalyzes polyadenylation of mRNA precursors*. Curr Opin Genet Dev, 1995. **5**(2): p. 222-8.
12. Hirose, Y. and Manley, J.L. *RNA polymerase II and the integration of nuclear events*. Genes & Development, 2000. **14**(12): p. 1415-1429.
13. Shatkin, A.J. and Manley, J.L. *The ends of the affair: Capping and polyadenylation*. Nature Structural Biology, 2000. **7**(10): p. 838-842.
14. Chabot, B., Bisotto, S. and Vincent, M. *The Nuclear Matrix Phosphoprotein P255 Associates with Splicing Complexes as Part of the [U4/U6.U5] Tri-Snmp Particle*. Nucleic Acids Research, 1995. **23**(16): p. 3206-3213.
15. Colot, H.V., Stutz, F. and Rosbash, M. *The yeast splicing factor Mud13p is a commitment complex component and corresponds to CBP20 the small subunit of the nuclear cap-binding complex*. Genes & Development, 1996. **10**(13): p. 1699-1708.
16. Sachs, A.B., Sarnow, P. and Hentze, M.W. *Starting at the beginning, middle, and end: Translation initiation in eukaryotes*. Cell, 1997. **89**(6): p. 831-838.
17. Dahmus, M.E. *Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(32): p. 19009-19012.

18. Hawkins, J.D. *A Survey on Intron and Exon Lengths*. Nucleic Acids Research, 1988. **16**(21): p. 9893-9908.
19. Fedorova, L. and Fedorov, A. *Puzzles of the human genome: Why do we need our introns?* Current Genomics, 2005. **6**(8): p. 589-595.
20. Edgell, D.R., Chalamcharla, V.R. and Belfort, M. *Learning to live together: mutualism between self-splicing introns and their hosts*. BMC Biology, 2011. **9**.
21. Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. *Self-Splicing RNA - Auto-Excision and Auto-Cyclization of the Ribosomal-RNA Intervening Sequence of Tetrahymena*. Cell, 1982. **31**(1): p. 147-157.
22. Lambowitz, A.M. and Zimmerly, S. *Group II Introns: Mobile Ribozymes that Invade DNA*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(8).
23. Jacquier, A. *Group II introns: Elaborate ribozymes*. Biochimie, 1996. **78**(6): p. 474-487.
24. Abelson, J., Trotta, C.R. and Li, H. *tRNA splicing*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(21): p. 12685-12688.
25. Lund, E. and Dahlberg, J.E. *Initiation of Escherichia coli ribosomal RNA synthesis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(11): p. 5480-4.
26. Villa, T., Pleiss, J.A. and Guthrie, C. *Spliceosomal snRNAs: Mg²⁺-dependent chemistry at the catalytic core?* Cell, 2002. **109**(2): p. 149-152.
27. Kramer, A. *The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing*. Annual Review of Biochemistry, 1996. **65**: p. 367-409.
28. Turunen, J.J., Niemela, E.H., Verma, B. and Frilander, M.J. *The significant other: splicing by the minor spliceosome*. Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA, 2013. **4**(1): p. 61-76.
29. David, C.J., Boyne, A.R., Millhouse, S.R. and Manley, J.L. *The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65-Prp19 complex*. Genes & Development, 2011. **25**(9): p. 972-983.
30. Burge, C.B., Padgett, R.A. and Sharp, P.A. *Evolutionary fates and origins of U12-type introns*. Molecular Cell, 1998. **2**(6): p. 773-785.
31. Will, C.L., Schneider, C., Reed, R. and Luhrmann, R. *Identification of both shared and distinct proteins in the major and minor spliceosomes*. Science, 1999. **284**(5422): p. 2003-2005.
32. de Miranda, E.R., De Marco, L. and Soares, M.M.S. *Splicing variants impact in thyroid normal physiology and pathological conditions*. Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia, 2009. **53**(6): p. 709-715.
33. Black, D.L. *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*. Annual Review of Biochemistry, 2003. **72**: p. 291-336.
34. Mironov, A.A., Fickett, J.W. and Gelfand, M.S. *Frequent alternative splicing of human genes*. Genome Research, 1999. **9**(12): p. 1288-1293.
35. Cline, M.S., Shigeta, R., Wheeler, R.L., Siani-Rose, M.A., Kulp, D. and Loraine, A.E. *The effects of alternative splicing on transmembrane proteins in the mouse genome*. Pacific Symposium on Biocomputing 2004, 2003: p. 17-28.
36. Demir, E. and Dickson, B.J. *fruitless splicing specifies male courtship behavior in Drosophila*. Cell, 2005. **121**(5): p. 785-794.

37. Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G. and Ruberti, G. *3 Functional Soluble Forms of the Human Apoptosis-Inducing Fas Molecule Are Produced by Alternative Splicing*. Journal of Immunology, 1995. **154**(6): p. 2706-2713.
38. Rosenfeld, M.G., Mermod, J.J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W. and Evans, R.M. *Production of a Novel Neuropeptide Encoded by the Calcitonin Gene Via Tissue-Specific RNA Processing*. Nature, 1983. **304**(5922): p. 129-135.
39. Lynch, K.W. and Weiss, A. *A model system for activation-induced alternative splicing of CD45 Pre-mRNA in T cells implicates protein kinase C and Ras*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(1): p. 70-80.
40. Caudevilla, C., Da Silva-Azevedo, L., Berg, B., Guhl, E., Graessmann, M. and Graessmann, A. *Heterologous HIV-nef mRNA trans-splicing: a new principle how mammalian cells generate hybrid mRNA and protein molecules*. Febs Letters, 2001. **507**(3): p. 269-279.
41. Maniatis, T. and Tasic, B. *Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 236-243.
42. Caceres, J.F. and Kornblihtt, A.R. *Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease*. Trends in Genetics, 2002. **18**(4): p. 186-193.
43. Krawczak, M., Reiss, J. and Cooper, D.N. *The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences*. Hum Genet, 1992. **90**(1-2): p. 41-54.
44. Smith, C.W.J., Patton, J.G. and Nadalginard, B. *Alternative Splicing in the Control of Gene-Expression*. Annual Review of Genetics, 1989. **23**: p. 527-577.
45. Zahler, A.M., Lane, W.S., Stolk, J.A. and Roth, M.B. *Sr Proteins - a Conserved Family of Pre-Messenger-RNA Splicing Factors*. Genes & Development, 1992. **6**(5): p. 837-847.
46. Wang, Z.F. and Burge, C.B. *Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code*. RNA-a Publication of the RNA Society, 2008. **14**(5): p. 802-813.
47. Schaal, T.D. and Maniatis, T. *Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(1): p. 261-273.
48. Tacke, R., Chen, Y. and Manley, J.L. *Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: Creation of an SRp40-specific splicing enhancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(4): p. 1148-1153.
49. Fu, X.D. *The Superfamily of Arginine Serine-Rich Splicing Factors*. RNA-a Publication of the RNA Society, 1995. **1**(7): p. 663-680.
50. Hanamura, A., Caceres, J.F., Mayeda, A., Fianza, B.R. and Krainer, A.R. *Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors*. RNA-a Publication of the RNA Society, 1998. **4**(4): p. 430-444.
51. Cramer, P., Pesce, C.G., Baralle, F.E. and Kornblihtt, A.R. *Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing*. Proceedings of the

- National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(21): p. 11456-11460.
52. ČR, Ú.z.i.a.s.Č.v.s.s.N.o.r., Ed., *Novotvary 2009 ČR*, (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR ve spolupráci s Národním onkologickým registrem ČR, 2009).
 53. Organisation, W.H. *Causes of Death*. The global burden of disease, 2004.
 54. Gann, P.H., Fought, A., Deaton, R., Catalona, W.J. and Vonesh, E. *Risk Factors for Prostate Cancer Detection After a Negative Biopsy: A Novel Multivariable Longitudinal Approach*. Journal of Clinical Oncology, 2010. **28**(10): p. 1714-1720.
 55. A. Heidenreich, P.J.B., J. Bellmunt, M. Bolla, S. Joniau, M.D. Mason, V. Matveev, N. Mottet, T.H. van der Kwast, T. Wiegel, F. Zattoni, Ed., *Guidelines on Prostate Cancer*, (European Association of Urology 2012).
 56. Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P. and Chu, T.M. *Purification of a Human-Prostate Specific Antigen*. Investigative Urology, 1979. **17**(2): p. 159-163.
 57. Lilja, H., Christensson, A., Dahlen, U., Matikainen, M.T., Nilsson, O., Pettersson, K. and Lovgren, T. *Prostate-Specific Antigen in Serum Occurs Predominantly in Complex with Alpha-1-Antichymotrypsin*. Clinical Chemistry, 1991. **37**(9): p. 1618-1625.
 58. Epstein, J.I. *An Update of the Gleason Grading System*. Journal of Urology, 2010. **183**(2): p. 433-440.
 59. Eifler, J.B., Feng, Z.Y., Lin, B.M., Partin, M.T., Humphreys, E.B., Han, M., Epstein, J.I., Walsh, P.C., et al. *An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011*. Bju International, 2013. **111**(1): p. 22-29.
 60. Misop Han, A.W.P., Marianna Zahurak, Steven Piantadosi, Jonathan I. Epstein, and Patrick C. Walsh. Přístupné na: <http://urology.jhu.edu/prostate/hanTables.php>. (27. 5. 2013)
 61. You, J.J., Cozzi, P., Walsh, B., Willcox, M., Kearsley, J., Russell, P. and Li, Y. *Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression*. Critical Reviews in Oncology Hematology, 2010. **73**(1): p. 10-22.
 62. Reinholt, F.P., Hultenby, K., Oldberg, A. and Heinegard, D. *Osteopontin - a Possible Anchor of Osteoclasts to Bone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(12): p. 4473-4475.
 63. Ahmed, M., Behera, R., Chakraborty, G., Jain, S., Kumar, V., Sharma, P., Bulbule, A., Kale, S., et al. *Osteopontin: a potentially important therapeutic target in cancer*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2011. **15**(9): p. 1113-1126.
 64. Hunter, G.K., Kyle, C.L. and Goldberg, H.A. *Modulation of Crystal-Formation by Bone Phosphoproteins - Structural Specificity of the Osteopontin-Mediated Inhibition of Hydroxyapatite Formation*. Biochemical Journal, 1994. **300**: p. 723-728.
 65. Hunter, G.K., Hauschka, P.V., Poole, A.R., Rosenberg, L.C. and Goldberg, H.A. *Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins*. Biochemical Journal, 1996. **317**: p. 59-64.
 66. Ihara, H., Denhardt, D.T., Furuya, K., Yamashita, T., Muguruma, Y., Tsuji, K., Hruska, K.A., Higashio, K., et al. *Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(16): p. 13065-13071.

67. Senger, D.R., Wirth, D.F. and Hynes, R.O. *Transformed Mammalian-Cells Secrete Specific Proteins and Phosphoproteins*. Cell, 1979. **16**(4): p. 885-893.
68. Lin, C.Q. and Bissell, M.J. *Multifaceted Regulation of Cell-Differentiation by Extracellular-Matrix*. Faseb Journal, 1993. **7**(9): p. 737-743.
69. Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F. and Giachelli, C.M. *NF-kappa B mediates alpha v beta 3 integrin-induced endothelial cell survival*. Journal of Cell Biology, 1998. **141**(4): p. 1083-1093.
70. Nemir, M., Devouge, M.W. and Mukherjee, B.B. *Normal Rat-Kidney Cells Secrete Both Phosphorylated and Nonphosphorylated Forms of Osteopontin Showing Different Physiological-Properties*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(30): p. 18202-18208.
71. Somerman, M.J., Prince, C.W., Butler, W.T., Foster, R.A., Moehring, J.M. and Sauk, J.J. *Cell Attachment Activity of the 44-Kilodalton Bone Phosphoprotein Is Not Restricted to Bone-Cells*. Matrix, 1989. **9**(1): p. 49-54.
72. Ross, F.P., Chappel, J., Alvarez, J.I., Sander, D., Butler, W.T., Farachcarson, M.C., Mintz, K.A., Robey, P.G., et al. *Interactions between the Bone-Matrix Proteins Osteopontin and Bone Sialoprotein and the Osteoclast Integrin Alpha-V-Beta-3 Potentiate Bone-Resorption*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(13): p. 9901-9907.
73. Feldinghabermann, B., Ruggeri, Z.M. and Cheresch, D.A. *Distinct Biological Consequences of Integrin-Alpha-V-Beta-3-Mediated Melanoma Cell-Adhesion to Fibrinogen and Its Plasmic Fragments*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(8): p. 5070-5077.
74. Hijiya, N., Setoguchi, M., Matsuura, K., Higuchi, Y., Akizuki, S. and Yamamoto, S. *Cloning and Characterization of the Human Osteopontin Gene and Its Promoter*. Biochemical Journal, 1994. **303**: p. 255-262.
75. Tang, X.J., Li, J.F., Yu, B.Q., Su, L.P., Yu, Y.Y., Yan, M., Liu, B.Y. and Zhu, Z.G. *Osteopontin Splice Variants Differentially Exert Clinicopathological Features and Biological Functions in Gastric Cancer*. International Journal of Biological Sciences, 2013. **9**(1): p. 55-66.
76. Tilli, T.M., Thuler, L.C., Matos, A.R., Coutinho-Camillo, C.M., Soares, F.A., da Silva, E.A., Neves, A.F., Goulart, L.R., et al. *Expression analysis of osteopontin mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. Exp Mol Pathol, 2012. **92**(1): p. 13-9.
77. Forootan, S.S., Foster, C.S., Aachi, V.R., Adamson, J., Smith, P.H., Lin, K. and Ke, Y.Q. *Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer*. International Journal of Cancer, 2006. **118**(9): p. 2255-2261.
78. Hotte, S.J., Winkist, E.W., Stitt, L., Wilson, S.M. and Chambers, A.F. *Plasma osteopontin - Associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma*. Cancer, 2002. **95**(3): p. 506-512.
79. Mirza, M., Shaughnessy, E., Hurley, J.K., Vanpatten, K.A., Pestano, G.A., He, B. and Weber, G.F. *Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer*. International Journal of Cancer, 2008. **122**(4): p. 889-897.

80. Shinohara, M.L., Kim, H.J., Kim, J.H., Garcia, V.A. and Cantor, H. *Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(20): p. 7235-7239.
81. Chen, C.D., Welsbie, D.S., Tran, C., Baek, S.H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M.G. and Sawyers, C.L. *Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy*. Nature Medicine, 2004. **10**(1): p. 33-39.
82. Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C. and Haelens, A. *Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling*. Nucl Recept Signal, 2008. **6**: p. e008.
83. Knudsen, K.E. and Scher, H.I. *Starving the Addiction: New Opportunities for Durable Suppression of AR Signaling in Prostate Cancer*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(15): p. 4792-4798.
84. Centenera, M.M., Harris, J.M., Tilley, W.D. and Butler, L.M. *The Contribution of Different Androgen Receptor Domains to Receptor Dimerization and Signaling*. Molecular Endocrinology, 2008. **22**(11): p. 2373-2382.
85. Balk, S.P. and Knudsen, K.E. *AR, the cell cycle, and prostate cancer*. Nucl Recept Signal, 2008. **6**: p. e001.
86. Labrie, F., Cusan, L., Gomez, J.L., Martel, C., Berube, R., Belanger, P., Belanger, A., Vandenput, L., et al. *Comparable amounts of sex steroids are made outside the gonads in men and women: Strong lesson for hormone therapy of prostate and breast cancer*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2009. **113**(1-2): p. 52-56.
87. Albertson, D.G. *Gene amplification in cancer*. Trends in Genetics, 2006. **22**(8): p. 447-55.
88. Grad, J.M., Dai, J.L., Wu, S. and Burnstein, K.L. *Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA*. Molecular Endocrinology, 1999. **13**(11): p. 1896-1911.
89. Craft, N., Shostak, Y., Carey, M. and Sawyers, C.L. *A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase*. Nature Medicine, 1999. **5**(3): p. 280-285.
90. McDonnell, T.J., Troncoso, P., Brisbay, S.M., Logothetis, C., Chung, L.W.K., Hsieh, J.T., Tu, S.M. and Campbell, M.L. *Expression of the Protooncogene Bcl-2 in the Prostate and Its Association with Emergence of Androgen-Independent Prostate-Cancer*. Cancer Research, 1992. **52**(24): p. 6940-6944.
91. Raffo, A.J., Perlman, H., Chen, M.W., Day, M.L., Streitman, J.S. and Buttyan, R. *Overexpression of Bcl-2 Protects Prostate-Cancer Cells from Apoptosis in-Vitro and Confers Resistance to Androgen Depletion in-Vivo*. Cancer Research, 1995. **55**(19): p. 4438-4445.
92. Hu, R., Isaacs, W.B. and Luo, J. *A Snapshot of the Expression Signature of Androgen Receptor Splicing Variants and Their Distinctive Transcriptional Activities*. Prostate, 2011. **71**(15): p. 1656-1667.
93. Hu, R., Dunn, T.A., Wei, S.Z., Isharwal, S., Veltri, R.W., Humphreys, E., Han, M., Partin, A.W., et al. *Ligand-Independent Androgen Receptor Variants Derived from*

- Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone-Refractory Prostate Cancer*. Cancer Research, 2009. **69**(1): p. 16-22.
94. Guo, Z.Y., Yang, X., Sun, F., Jiang, R.C., Linn, D.E., Chen, H.G., Chen, H.G., Kong, X.T., et al. *A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is Up-regulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen Depletion-Resistant Growth*. Cancer Research, 2009. **69**(6): p. 2305-2313.
 95. Hornberg, E., Ylitalo, E.B., Crnalic, S., Antti, H., Stattin, P., Widmark, A., Bergh, A. and Wikstrom, P. *Expression of Androgen Receptor Splice Variants in Prostate Cancer Bone Metastases is Associated with Castration-Resistance and Short Survival*. Plos One, 2011. **6**(4).
 96. Sun, S.H., Sprenger, C.C.T., Vessella, R.L., Haugk, K., Soriano, K., Mostaghel, E.A., Page, S.T., Coleman, I.M., et al. *Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant*. Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(8): p. 2715-2730.
 97. Haile, S. and Sadar, M.D. *Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011. **68**(24): p. 3971-3981.
 98. Foss, C.A., Mease, R.C., Cho, S.Y., Kim, H.J. and Pomper, M.G. *GCPH Imaging and Cancer*. Current Medicinal Chemistry, 2012. **19**(9): p. 1346-1359.
 99. Kularatne, S.A., Wang, K., Santhapuram, H.K.R. and Low, P.S. *Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Imaging and Therapy of Prostate Cancer Using a PSMA Inhibitor as a Homing Ligand*. Molecular Pharmaceutics, 2009. **6**(3): p. 780-789.
 100. Wang, L., Li, L., Guo, Y., Tong, H., Fan, X., Ding, J. and Huang, H. *Construction and in vitro/in vivo targeting of PSMA-targeted nanoscale microbubbles in prostate cancer*. Prostate, 2013.
 101. Berger, U.V., Carter, R.E. and Coyle, J.T. *The Immunocytochemical Localization of N-Acetylaspartyl Glutamate, Its Hydrolyzing Enzyme Naaladase, and the Nmdar-1 Receptor at a Vertebrate Neuromuscular-Junction*. Neuroscience, 1995. **64**(4): p. 847-850.
 102. O'Keefe, D.S., Su, S.L., Bacich, D.J., Horiguchi, Y., Luo, Y., Powell, C.T., Zandvliet, D., Russell, P.J., et al. *Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene*. Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression, 1998. **1443**(1-2): p. 113-127.
 103. Schulke, N., Varlamova, O.A., Donovan, G.P., Ma, D.S., Gardner, J.P., Morrissey, D.M., Arrigale, R.R., Zhan, C.C., et al. *The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(22): p. 12590-12595.
 104. Holmes, E.H., Greene, T.G., Tino, W.T., Boynton, A.L., Aldape, H.C., Misrock, S.L. and Murphy, G.P. *Analysis of glycosylation of prostate-specific membrane antigen derived from LNCaP cells, prostatic carcinoma tumors, and serum from prostate cancer patients*. Prostate, 1996: p. 25-29.
 105. Horoszewicz, J.S., Kawinski, E. and Murphy, G.P. *Monoclonal-Antibodies to a New Antigenic Marker in Epithelial Prostatic Cells and Serum of Prostatic-Cancer Patients*. Anticancer Research, 1987. **7**(5): p. 927-936.

106. Robinson, M.B., Blakely, R.D., Couto, R. and Coyle, J.T. *Hydrolysis of the Brain Dipeptide N-Acetyl-L-Aspartyl-L-Glutamate - Identification and Characterization of a Novel N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipeptidase Activity from Rat-Brain*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(30): p. 14498-14506.
107. Sacha, P., Zamecnik, J., Barinka, C., Hlouchova, K., Vicha, A., Mlcochova, P., Hilgert, I., Eckschlager, T., et al. *Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain*. Neuroscience, 2007. **144**(4): p. 1361-1372.
108. Pinto, J.T., Suffoletto, B.P., Berzin, T.M., Qiao, C.H., Lin, S.L., Tong, W.P., May, F., Mukherjee, B., et al. *Prostate-specific membrane antigen: A novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells*. Clinical Cancer Research, 1996. **2**(9): p. 1445-1451.
109. Baccala, A., Sercia, L., Li, J.B., Heston, W. and Zhou, M. *Expression of prostate-specific membrane antigen in tumor-associated neovasculature of renal neoplasms*. Urology, 2007. **70**(2): p. 385-390.
110. Carter, R.E., Feldman, A.R. and Coyle, J.T. *Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuropeptidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(2): p. 749-753.
111. Mhawech-Fauceglia, P., Zhang, S., Terracciano, L., Sauter, G., Chadhuri, A., Herrmann, F.R. and Penetrante, R. *Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique*. Histopathology, 2007. **50**(4): p. 472-483.
112. Cunha, A.C., Weigle, B., Kiessling, A., Bachmann, M. and Rieber, E.P. *Tissue-specificity of prostate specific antigens: Comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues*. Cancer Letters, 2006. **236**(2): p. 229-238.
113. Kinoshita, Y., Kuratsukuri, K., Landas, S., Imaida, K., Rovito, P.M., Wang, C.Y. and Haas, G.P. *Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues*. World Journal of Surgery, 2006. **30**(4): p. 628-636.
114. Israeli, R.S., Powell, C.T., Corr, J.G., Fair, W.R. and Heston, W.D.W. *Expression of the Prostate-Specific Membrane Antigen*. Cancer Research, 1994. **54**(7): p. 1807-1811.
115. Murphy, G.P., Snow, P.B., Brandt, J., Elgamal, A. and Brawer, M.K. *Evaluation of prostate cancer patients receiving multiple staging tests, including ProstaScint (R) scintiscans*. Prostate, 2000. **42**(2): p. 145-149.
116. Rajasekaran, A.K., Anilkumar, G. and Christiansen, J.J. *Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?* American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2005. **288**(5): p. C975-C981.
117. Ellis, R.J., Kaminsky, D.A., Zhou, E.H., Fu, P.F., Chen, W.D., Brelvi, A., Faulhaber, P.F. and Bodner, D. *Ten-Year Outcomes: The Clinical Utility of Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography Capromab Pendetide (Prostascint) in a Cohort Diagnosed with Localized Prostate Cancer*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2011. **81**(1): p. 29-34.
118. Mesters, J.R., Barinka, C., Li, W.X., Tsukamoto, T., Majer, P., Slusher, B.S., Konvalinka, J. and Hilgenfeld, R. *Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug*

- target in neuronal damage and prostate cancer*. Embo Journal, 2006. **25**(6): p. 1375-1384.
119. Davis, M.I., Bennett, M.J., Thomas, L.M. and Bjorkman, P.J. *Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(17): p. 5981-5986.
 120. Su, S.L., Huang, I.P., Fair, W.R., Powell, C.T. and Heston, W.D.W. *Alternatively Spliced Variants of Prostate-Specific Membrane Antigen RNA - Ratio of Expression as a Potential Measurement of Progression*. Cancer Research, 1995. **55**(7): p. 1441-1443.
 121. Mlcochova, P., Barinka, C., Tykvart, J., Sacha, P. and Konvalinka, J. *Prostate-Specific Membrane Antigen and Its Truncated Form PSM '*. Prostate, 2009. **69**(5): p. 471-479.
 122. Grauer, L.S., Lawler, K.D., Marignac, J.L., Kumar, A., Goel, A.S. and Wolfert, R.L. *Identification, purification, and subcellular localization of prostate-specific membrane antigen PSM ' protein in the LNCaP prostatic carcinoma cell line*. Cancer Research, 1998. **58**(21): p. 4787-4789.
 123. Schmittgen, T.D., Tiske, S., Vessella, R.L., True, L.D. and Zakrajsek, B.A. *Expression of prostate specific membrane antigen and three alternatively spliced variants of PSMA in prostate cancer patients*. International Journal of Cancer, 2003. **107**(2): p. 323-329.
 124. Cao, K.Y., Mao, X.P., Wang, D.H., Xu, L., Yuan, G.Q., Dai, S.Q., Zheng, B.J. and Qiu, S.P. *High expression of PSM-E correlated with tumor grade in prostate cancer: A new alternatively spliced variant of prostate-specific membrane antigen*. Prostate, 2007. **67**(16): p. 1791-1800.
 125. Williams, T. and Kole, R. *Analysis of prostate-specific membrane antigen splice variants in LNCap cells*. Oligonucleotides, 2006. **16**(2): p. 186-195.
 126. Bzdega, T., Turi, T., Wroblewska, B., She, D.W., Chung, H.S., Kim, H. and Neale, J.H. *Molecular cloning of a peptidase against N-acetylaspartylglutamate from a rat hippocampal cDNA library*. Journal of Neurochemistry, 1997. **69**(6): p. 2270-2277.
 127. Devlin, A.M., Ling, E.H., Peerson, J.M., Fernando, S., Clarke, R., Smith, A.D. and Halsted, C.H. *Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia*. Human Molecular Genetics, 2000. **9**(19): p. 2837-2844.
 128. Hlouchova, K., Navratil, V., Tykvart, J., Sacha, P. and Konvalinka, J. *GCPH Variants, Paralogs and Orthologs*. Current Medicinal Chemistry, 2012. **19**(9): p. 1316-1322.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka